

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N°

00597

**ÉTUDE DES MODALITÉS D'ADAPTATION
DES COXSACKIEVIRUS A
A DIFFÉRENTES CELLULES EN CULTURE**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard - Lyon
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 28 Septembre 1972

par

Jean-Jacques CHOMEL

né le 3 Novembre 1943

à CHALON-SUR-SAONE (Saône-et-Loire)

**UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES**

Année 1972 - N°

**ÉTUDE DES MODALITÉS D'ADAPTATION
DES COXSACKIEVIRUS A
A DIFFÉRENTES CELLULES EN CULTURE**

THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard - Lyon
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 28 Septembre 1972

par

Jean-Jacques CHOMEL

né le 3 Novembre 1943

à CHALON-SUR-SAONE (Saône-et-Loire)

ÉTUDE DES MODALITÉS D'ADAPTATION
DES COXSACKIEVIRUS A
A DIFFÉRENTES CELLULES EN CULTURE



THÈSE

pour le Doctorat de l'Université de Lyon
Section de PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Claude-Bernard - Lyon
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

le 28 Septembre 1972

par

Jean-Jacques CHOMEL

né le 3 Novembre 1943

À CHALON-SUR-SAÔNE (Saône-et-Loire)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : Monsieur le Professeur J. BOIDIN
1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences-Agrégé
2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître Assistant
3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Unités	Directeurs
U.E.R. Médicale Grange-Blanche	M. le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. Médicale Alexis Carrel	M. le Professeur C. GIROD
U.E.R. Médicale Lyon-Nord	M. le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. Médicale Lyon-Sud-Ouest	M. le Professeur L. TOLOT
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques	M. M. CARRAZ, Maître de Conférences-Agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN
U.E.R. de Biologie Humaine	M. J. C. CZYBA, Maître de Conférences-Agrégé
Institut Régional d'Education Physique et Sportive	M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.
U.E.R. de Mathématiques	M. le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie.	Mlle le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M. le Professeur J. CHANEL
U.E.R. de Physique Nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
Institut Universitaire de Technologie I	M. le Professeur L. FEUVRAIS
Institut Universitaire de Technologie II	M. J. GALLET
Observatoire	M. le Professeur J. H. BIGAY

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Président : Monsieur le Professeur R. SOHIER,

Assesseurs : Monsieur le Professeur Agrégé J. GRAS,
Monsieur le Professeur Agrégé M. SEPETJIAN,
Monsieur le Professeur Agrégé J. TERRAILLON,
Madame le Docteur O.G. GAUDIN.

A mes Parents,

A ma Femme,

A mes Enfants : Anne et Sébastien.

C'est à vous que je dédie ce travail,
avec toute ma tendresse.

A mon Frère,

A ma Soeur,

A toute ma Famille,

Avec toute mon affection.

A notre Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur R. SÖHIER.

Nous le remercions d'avoir bien voulu nous accueillir dans son laboratoire.

En acceptant de nous compter parmi ses collaborateurs, il nous a accordé sa confiance.

Sa rigueur scientifique restera pour nous un exemple.

Qu'il trouve ici l'expression de notre profond respect et de notre sincère attachement.

A nos Juges,

Monsieur le Professeur Agrégé GRAS,

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous fait en acceptant d'être notre juge et l'assurons de notre respectueuse reconnaissance.

Monsieur le Professeur Agrégé SEPETJIAN,

Il a accepté de juger notre travail.

Nous sommes très sensible à l'honneur qu'il veut bien nous faire et le prions de croire à notre profond respect.

Monsieur le Professeur Agrégé TERRAILLON,

Il nous a toujours manifesté sa bienveillante amabilité et prodigué ses conseils avertis.

Qu'il nous autorise à lui exprimer notre profonde gratitude.

A Madame le Docteur GAUDIN,

Nous avons au cours de notre travail pu apprécier l'immensité de son savoir et la clarté de sa pensée. Ses conseils furent toujours judicieux et sa compréhension bienveillante.

Qu'elle soit infiniment remerciée d'avoir bien voulu siéger parmi nos juges.

Nous la prions de croire à notre profond attachement.

A mes Amis,

A mes Collaborateurs,

INTRODUCTION

Les entérovirus sont de très petits virus à acide ribonucléique faisant partie d'un plus vaste ensemble : le groupe des PICORNAVIRUS (MELNICK et le comité des ENTEROVIRUS, 1962, 1963).

On les divise en deux sous-groupes :

- Les ENTEROVIRUS qui comprennent les Poliovirus, les Cocksackievirus A et B, les Echovirus.
- Les RHINOVIRUS.

La taille des Entérovirus est voisine de 30 nm.

Ces virus ont plusieurs propriétés physico-chimiques communes.

On notera que :

- leur génome est constitué d'un acide ribonucléique,
- leur taille est comprise entre 20 et 30 nm,
- la particule virale ne possède pas d'enveloppe. Ce sont des virus "nus",
- la particule infectieuse est stabilisée vis-à-vis des variations de température par les ions métalliques bivalents, notamment l'ion Mg^{++} (WALLIS et MELNICK, 1962),
- leur stabilité à pH 3 les oppose aux RHINOVIRUS qui ne possèdent pas cette propriété (TYRELL, 1963),
- la multiplication du virus est intracytoplasmique : elle se traduit par l'apparition d'une masse d'abord éosinophile, puis par des granulations basophiles ; les noyaux rejetés à la périphérie montrent précocement des inclusions éosinophiles.

Si nous nous en tenons aux ENTEROVIRUS, il est classique de distinguer :

- Les POLIOVIRUS de type 1, 2 et 3.
- Les COXSACKIEVIRUS A et B
- Les ECHOVIRUS.

Dans notre travail, nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude des COXSACKIEVIRUS A.

Cependant, nous avons jugé utile de faire un bref rappel sur les COXSACKIEVIRUS A et B.

LES COXSACKIEVIRUS :

Depuis l'isolement du premier sérotype de COXSACKIEVIRUS en 1947 par DALLDORF, dans la ville de COXSACKIE, à partir de matières fécales de malades atteints de poliomyélite, ce groupe viral s'est enrichi de façon considérable.

Ces virus sont divisés en deux groupes selon les lésions histologiques que provoque leur inoculation aux souriceaux nouveau-nés, système cellulaire qui a permis de bien individualiser ces virus en raison de leur pouvoir pathogène caractéristique sur ce système.

On distingue :

- Les COXSACKIEVIRUS A dont on connaît 23 types. Il existe le type A 24, mais en fait il n'y a réellement que 23 types de COXSACKIEVIRUS A car le type A 23 n'est autre que l'ECHOVIRUS type 9.

L'exemple d'un tel virus, classé selon les uns comme un ECHOVIRUS, comme un COXSACKIERUS pour les autres, démontre la difficulté d'établir des critères solides de classement d'un virus dans un genre.

- Les COXSACKIEVIRUS B dont on connaît 6 types numérotés de 1 à 6.

a) Pouvoir pathogène expérimental :

L'inoculation à des souriceaux de moins de 48 heures par les COXSACKIEVIRUS A produit après une période d'incubation de 2 à 6 jours une paralysie flasque avec atteinte des muscles striés, en particulier des membres postérieurs de l'animal, que l'inoculation ait été faite par voie intra-musculaire, intra-péritonéale ou intra-cérébrale.

L'examen histologique montre deux types de lésions :

- une réaction inflammatoire avec hyperhémie et infiltration leucocytaire intersticielle.
- une nécrose éosinophile et une dégénérescence hyaline des cellules des fibres musculaires.

L'inoculation à des souriceaux de moins de 24 heures de COXSACKIEVIRUS B provoque après incubation de 4 à 12 jours :

- l'apparition d'une paralysie spasmodique avec tremblements,
- à l'encontre des lésions dues aux COXSACKIEVIRUS A, s'il existe une myosite, elle est toujours discrète et touche essentiellement le myocarde.
- une nécrose du tissu adipeux, tissu bien visible dans la région interscapulaire.
- enfin très souvent, quelque soit la voie d'administration du virus, on observe des lésions de nécrose du cortex cérébral.

b) Pathologie humaine :

Chez l'homme, les manifestations cliniques sont diverses. Ils peuvent provoquer :

Pour les COXSACKIEVIRUS A :

- des méningites,
- des paralysies,
- une angine vésiculeuse ou herpangine,
- des éruptions rubéoliformes,
- une stomatite vésiculeuse,
- des affections respiratoires (type A 21).

Pour les COXSACKIEVIRUS B :

- des méningites,
- des paralysies,
- des affections respiratoires (CB 3),
- la maladie de BORNHOLM ou myalgie épidémique,
- des myocardites néo-natales graves,
- des syndromes abdominaux douloureux.

c) Développement sur cultures de tissu :

Sur cultures de tissu, les effets cytopathiques sont différents selon les deux groupes :

Pour les COXSACKIEVIRUS A :

Ces virus ne montrent que peu d'aptitude à la multiplication en cultures de cellules.

La plupart des types ne provoquent pas d'effet cytopathique à l'isolement sauf :

- | | |
|---|------------|
| . sur cellules de rein de singe | : 1e CA 9 |
| | 1e CA 7 |
| | 1e CA 16 |
| . sur cellules amniotiques primaires humaines | : 1e CA 11 |
| | 1e CA 13 |
| | 1e CA 15 |
| | 1e CA 18 |

Notons que sur cette dernière cellule, d'autres types ont pu être adaptés mais ce système cellulaire ne saurait constituer un moyen d'isolement en pratique courante.

Pour les COXSACKIEVIRUS B :

Le développement des virus COXSACKIE B sur cellules ne pose pas de problème. En effet, ces virus se multiplient bien sur cellules primaires de rein de singe ou sur cellules Hep 2.

d) Diagnostic des affections à COXSACKIEVIRUS

Le problème est moins délicat pour les COXSACKIEVIRUS B que pour les A, puisque ces virus peuvent se développer sur culture de cellules.

La technique utilisée pour l'identification est la neutralisation sur cellules telle qu'on l'utilise pour les virus Polio et les Echovirus (GAUDIN et SOHIER, 1964).

En ce qui concerne les COXSACKIEVIRUS A, du fait de la difficulté de les adapter à un système cellulaire, l'identification sur souriceaux de la plupart des souches à l'aide de sérums spécifiques est seule utilisable. Or, il existe un grand nombre de types, ce qui rend long et coûteux cette méthode.

L'identification sérologique des COXSACKIEVIRUS A a été envisagée par LEPINE en 1962.

Contrairement aux COXSACKIEVIRUS B pour lesquels SCHMIDT et LENNETTE (1962 - a et b) ont pu mettre en évidence un antigène de groupe, il n'en est rien pour les COXSACKIEVIRUS A.

Il en résulte donc une identification délicate, longue et onéreuse pour ces virus du groupe A.

Ceci nous a amené à rechercher un système cellulaire permissif à ces virus.

CHAPITRE PREMIER

MATERIEL ET METHODES GENERALES *

Cette première partie sera consacrée à une récapitulation des différentes techniques utilisées au cours de notre travail.

Nous envisagerons tout d'abord les cultures de tissu.

CULTURES DE TISSU

Nous avons utilisé :

1°) des cultures primaires de tissu thyroïdien humain
en utilisant :

- comme milieu de croissance :

l'hydrolysate de lactalbumine en milieu de HANKS, contenant 2,5 % de rouge de phénol, 10 % de sérum de veau inactivé (1/2 h. à 56°C) et 0,1 % d'un mélange de Pénicilline/Streptomycine contenant 200.000 unités de Pénicilline et 0,2 g. de Streptomycine par ml.

- comme milieu de survie :

le milieu 199 de PARKER à 2 % de sérum foetal de veau.

2°) une subculture de cellules thyroïdiennes :

obtenue par trypsination, à l'aide de trypsine à 0,2 %, d'une nappe de cellules thyroïdiennes primaires, cultivées en flacons de ROUX.

- Le milieu de croissance consiste en de l'hydrolysate de lactalbumine en milieu de HANKS, à 10 % de sérum de veau.

- Le milieu de survie est le milieu 199 de PARKER, à 2 % de sérum foetal de veau.

3°) une lignée continue de cellules diploïdes d'embryons humains : la lignée WI 38.

- Le milieu de croissance consiste en du EAGLE MEM à 1,3 % de bicarbonate de soude et 10 % de sérum de veau ; on lui ajoute 0,1 % de mélange de Pénicilline et Streptomycine.

* Les méthodes particulières sont traitées dans les chapitres où sont consignés les résultats qu'elles ont permis d'obtenir.

- Le milieu de survie est le milieu de PARKER à 2 % de sérum foetal de veau.

4°) une lignée continue de cellules amniotiques humaines : la lignée Am 57

On utilise :

- comme milieu de croissance :
l'hydrolysate de lactalbumine à 0,3 % en EARLE, contenant du rouge de phénol et du bicarbonate de soude, 0,1 % de mélange Pénicilline/Streptomycine et 15 % de sérum de veau.
- comme milieu de survie :
le milieu 199 de PARKER à 2 % de sérum foetal de veau.

PREPARATION DES SUSPENSIONS VIRALES

1°) Suspensions virales destinées à rechercher la sensibilité des différentes cellules décrites précédemment :

a - Traitement des selles :

Les suspensions virales sont préparées à partir de selles de malades. Cette selle est traitée de la façon suivante :

On utilise un tube à centrifuger contenant quelques perles de verre et 8 ml de milieu 199 de PARKER.

On met en suspension dans ce milieu la valeur d'une noisette de selle. On homogénéise soigneusement et l'on agite 6 minutes sur un appareil agitateur type VORTEX.

On congèle alors le tube à -20°C pendant une nuit.

Le lendemain, le tube est décongelé, puis centrifugé en centrifugeuse réfrigérée, pendant 20 à 25 minutes à 5.000 tours par minute.

On décante.

Le surnageant constitue la suspension virale, inoculum que nous appellerons Po ou passage 0.

b - Inoculation à l'animal :

Les prélèvements ainsi traités seront injectés à des souriceaux nouveau-nés âgés de 24 heures au plus.

L'inoculation est faite par voie sous-cutanée à raison de 0,1 ml d'inoculum par souriceau.

Les animaux ainsi inoculés sont observés pendant 14 jours.

En principe, la mort apparaît en moins d'une semaine et les signes cliniques sont très caractéristiques.

On note l'apparition d'une paralysie flasque des membres postérieurs lorsqu'il s'agit d'un COXSACKIEVIRUS A.

On note également l'état de dénutrition de l'animal.

On le retrouve la plupart du temps, malade, enfoui sous la sciure constituant sa litière.

c - Préparation de la suspension virale à partir des souriceaux morts ou sacrifiés :

Il est souvent préférable de sacrifier l'animal malade plutôt que d'attendre sa mort ; le travail que nous allons décrire maintenant s'en trouve facilité.

On manipule en cage vitrée préalablement stérilisée aux U.V.

Le cadavre est dépouillé, éviscéré, après lui avoir supprimé l'extrémité des pattes, la queue et la tête.

La carcasse ainsi obtenue est congelée à -20°C et conservée à cette température.

Elle va servir à préparer un broyat infectieux destiné à un second passage sur souriceaux.

Cette carcasse est broyée à l'aide d'un pilon dans un mortier refroidi à -20°C .

Le broyat est mis en suspension dans 9 ml d'eau physiologique stérile.

On ajoute à cette suspension :

- 1.000 U de Pénicilline,
- 0,1 microgramme de Streptomycine.

On centrifuge alors à 2.500 tours/minute pendant 10 minutes. Le surnageant constitue la suspension virale qui est délipidée de la façon suivante :

une partie de la suspension antigénique et une partie d'éther refroidi (1 heure à -20°C) sont laissées en contact pendant 30 minutes à la température du laboratoire, puis on centrifuge à 3.000 tours par minute pendant 10 minutes.

Le liquide se sépare en trois phases :

- Ether,
- Couche graisseuse,
- Phase aqueuse.

La phase aqueuse constitue la suspension virale semi-purifiée.

Il s'agit ici d'un premier passage sur souriceaux qu'on appellera P1. A partir de ce premier passage, on pourra faire de nouveaux passages qu'on appellera P2, P3, etc...

Le troisième passage sera utilisé pour éprouver la sensibilité des systèmes cellulaires étudiés.

2°) Préparation de la suspension de virus CA 13 sur cellules Am 57

Nous avons utilisé la cellule Am 57 cultivée en flacons tournants (flacons en verre neutre de 250 ml).

Après 48 heures, toute la surface du flacon est recouverte par la nappe cellulaire.

On inocule à raison de 1 ml de la suspension virale titrant sur souriceaux nouveau-nés : 5×10^7 doses infectieuses/souriceaux par ml (*)

(*) Pour simplifier l'expression des titres infectieux, nous parlerons de "doses infectieuses/souriceaux" lorsque le titrage est effectué sur l'animal, et de "doses infectieuses/cellules X" lorsque le titrage est réalisé sur les cellules X. Il s'agit dans les deux cas de doses 50 %.

On ajoute 5 ml de milieu 199 de PARKER contenant 2 % de sérum foetal.
On récolte après dégénérescence complète des cellules.

Les cellules non détachées sont récoltées par grattage des parois du flacon.

On centrifuge à 5.000 tours/minute pendant 10 minutes pour éliminer les débris cellulaires.

Le surnageant constitue la suspension virale CA 13.

3°) Préparation de la suspension virale CA 1 :

La suspension CA 1 est préparée comme nous l'avons vu précédemment sur souriceaux nouveau-nés.

Le broyat des souriceaux, remis en suspension dans du milieu 199 de PARKER, puis délipidé, constitue la suspension virale CA 1.

TECHNIQUE DE CHROMATOGRAPHIE

La technique utilisée est celle mise au point dans notre Laboratoire par M. JEDDI et O.G. GAUDIN (1971).

Elle sera utilisée dans notre travail pour l'étude des suspensions virales CA 1 et CA 13.

1°) Choix des colonnes :

Ce sont des colonnes en verre munies de filtres cylindriques en verre, fritté de porosité zéro.

Ces colonnes mesurent 80 mm de hauteur et 20 mm de diamètre. On les nomme également tubes d'ALLIHN.

2°) Support :

Il est constitué par du phosphate de calcium (Bruschite) préparé par mélange d'une solution de phosphate de sodium 0,5 M et d'une solution de chlorure de calcium 0,5 M.

La solution de chlorure de calcium est contenue dans une ampoule à brome dont l'extrémité inférieure est munie d'une aiguille hypodermique (7/25) qui permet l'écoulement goutte à goutte dans la solution de phosphate de sodium, contenue dans un flacon placé sur un agitateur magnétique tournant à petite vitesse.

On obtient ainsi un précipité qui est lavé trois fois par décantation en tampon phosphate 0,01 M à pH 7.

On ramène ensuite au volume initial de la solution de chlorure de calcium ayant servi à le préparer, en ajustant avec le même tampon.

On utilise cette suspension de phosphate de calcium après 24 heures de repos.

La conservation peut être de plusieurs jours.

3°) Protocole expérimental :

On laisse sédimenter pendant une nuit la suspension de phosphate de calcium dans les colonnes.

Le lendemain, on dépose avec précaution la suspension virale à chromatographier à raison de 5 ml, de façon à ne pas briser le précipité.

On suit la progression du front en ajoutant à la suspension quelques gouttes de rouge de phénol qui vire au jaune au contact du phosphate de calcium.

Le volume du précipité est de l'ordre de 6 à 7 ml.

Lorsque l'antigène est fixé, ce qui correspond au moment où le front se trouve à la partie inférieure de la colonne, il faut alors éluer cet antigène.

La solution éluante consiste en un tampon de pH 7,2 préparé selon la technique de KOZA, par addition de 1 volume de phosphate monopotassique à 4 volumes de phosphate disodique.

On prépare 10 molarités successives :

- 0,01 M à 0,05 M

- 0,1 M à 0,5 M

Pour chaque molarité, on élue avec 5 ml du tampon (ce qui correspond au même volume que celui de l'échantillon déposé sur la colonne).

Chaque fraction récupérée est stabilisée par addition d'albumine bovine à 70 grammes par litre selon les concentrations indiquées dans le tableau n° 1 (*)

On s'arrange toujours pour avoir une molarité finale inférieure à 0,05 M, ou tout au plus égale à celle-ci, de façon à éliminer un éventuel pouvoir toxique des fractions chez l'animal.

Chaque fraction est ainsi diluée ; on tiendra compte de cette dilution dans le titrage de chacune d'elles.

4°) Techniques mises en oeuvre pour l'étude des éluats :

Selon le virus chromatographié, les éluats seront testés quant à leur pouvoir infectieux sur deux systèmes différents ; on utilisera :

- soit le souriceau nouveau-né pour le virus CA 1 non adapté à la cellule,
- soit une lignée cellulaire telle la lignée WI 38 pour le CA 13, bien adapté à cette cellule.

(*) Tous les tableaux, figures et graphes sont reportés à la fin de ce travail, avant la bibliographie.

TITRAGE DES SUSPENSIONS VIRALES

1°) Titration sur souriceaux nouveau-nés :

L'inoculation des fractions se fait sur 8 lots comprenant 10 souriceaux nouveau-nés par lot. On notera que pour chaque fraction 80 souriceaux sont nécessaires, soit 800 pour les 10 fractions. Chaque lot est inoculé avec les dilutions suivantes de la fraction considérée :

10^{-1} à 10^{-8} soit 8 dilutions par fraction.

L'inoculation se fait à raison de 0,1 ml par souriceau, par voie sous-cutanée.

On conserve les animaux pendant 15 jours en notant pour chaque dilution et chaque jour le nombre d'animaux morts.

Au bout de ces 15 jours, ce nombre ne varie plus ; il servira à la détermination du titre infectieux.

2°) Calcul du titre critique ou DL 50 (Dose létale 50 %) par la méthode des taux cumulatifs :

La dilution pour laquelle on observe une mortalité de 50 % des animaux correspond à la DL 50.

Cette dilution exprime le titre infectieux du virus.

On établit le titre infectieux par la méthode des taux cumulatifs de REED - MUNCH.

Prenons un exemple :

Supposons qu'à la dilution 10^{-5} : 10 animaux soient morts,
 10^{-6} : 8 animaux soient morts,
 10^{-7} : aucun animal ne soit mort,

nous aurons :

nous aurons :			<u>Taux cumulatifs</u>		<u>Mortalité</u>	
	<u>Morts</u>	<u>Vivants</u>	<u>Morts</u>	<u>Vivants</u>	<u>Fragmentée</u>	<u>%</u>
10^{-5}	10	0	18	0	18/18	100 %
10^{-6}	8	2	8 _A	2 _B	8/10	80 %
10^{-7}	0	10	0 _C	12 _D	0/12	0 %

On voit dans cet exemple que la DL 50 est comprise entre :

10^{-6} et 10^{-7}

si A : représente le nombre d'animaux morts à la plus forte concentration virale.

si B : représente le nombre d'animaux survivants à cette concentration.

si C : représente le nombre d'animaux morts à la plus faible concentration virale.

si D : représente le nombre d'animaux survivants à cette même concentration,

la distance proportionnelle entre les deux concentrations critiques à laquelle se trouve la DL 50 est donnée par la formule :

$$DP = \frac{(A - B)(C + D)}{2(AD - BC)}$$

Exemple :

$$DP = \frac{(8 - 2)(0 + 12)}{2(8 \times 12) - (2 \times 0)} = \frac{6 \times 12}{2 \times 96} = 0,38$$

Donc :

$$DL\ 50 = 10^{-6,38}$$

Soit : un titre infectieux de $2,4 \times 10^6$ doses infectieuses/souriceaux dans 0,1 ml.

3°) Titration des suspensions virales sur cellules :

Le principe est identique à celui du titrage précédent ; dans ce cas, on utilisera des tubes contenant la culture de cellules en phase stationnaire.

L'inoculation se fait pour chaque dilution sur 5 tubes de culture cellulaire.

Le nombre de dilutions s'étale de 10^{-1} à 10^{-8} .

Les tubes inoculés sont lus tous les jours.

On note le nombre de tubes dégénérés au 7ème jour.

Le calcul de la DICT 50 (Dose infectieuse sur culture de tissu) se fait exactement comme dans l'exemple précédent ; on parlera alors de tubes dégénérés et non d'animaux morts.

TECHNIQUE DE NEUTRALISATION SUR CELLULES

Le titrage de la suspension virale nous permet de déterminer la DICT 50 de cette suspension.

Or, la neutralisation se fait in vitro contre 100 DICT 50 de cette suspension.

1°) Principe de la technique :

Supposons un virus qui provoque sur une nappe cellulaire une dégénérescence des cellules.

Si ce virus est neutralisé par son antisérum spécifique contenant des anticorps neutralisants contre ce virus considéré, la nappe cellulaire est protégée.

2°) Technique :

On pratique une dilution du virus de façon à obtenir 100 DICT 50.

La dilution du sérum à utiliser a été préalablement déterminée.

Elle est fonction du titre de ce sérum.

La détermination du titre d'un sérum se fait par rapport à un prototype de COXSACKIEVIRUS A correspondant au type du sérum à titrer.

Des dilutions croissantes du sérum sont engagées contre 100 DICT 50 du virus préalablement titré.

Le mélange contact virus-sérum est inoculé sur cellules ; la dernière dilution du sérum pour laquelle les cellules sont encore protégées correspond au titre de ce sérum.

Connaissant ce titre, on détermine la dilution du sérum à engager en neutralisation :

elle est déterminée comme contenant 40 unités neutralisantes.

On fait un contact virus-sérum pendant 1 heure à la température du laboratoire entre :

{ 0,25 ml de la dilution du virus et
0,25 ml de la dilution du sérum.

Puis, on inocule 0,2 ml du mélange contact sur 2 tubes de culture cellulaire en phase stationnaire.

Un titrage de contrôle de la dilution de neutralisation du virus est pratiqué pour déterminer le nombre exact de doses infectieuses utilisées. La lecture se fait à 24 heures, puis tous les 2 jours ; le résultat définitif est lu à 7 jours.

Pour identifier les COXSACKIEVIRUS A, nous avons dû ainsi neutraliser les suspensions virales par les 23 antisérums spécifiques. Si une série de 2 tubes inoculés avec le mélange contact virus-sérum est protégée (c'est-à-dire si les cellules contenues dans ces tubes ne montrent pas d'effet cytopathique), connaissant l'antisérum qui a neutralisé la suspension virale, on peut ainsi déterminer le type de l'antigène viral en question.

TECHNIQUE DE MARQUAGE RADIO-ACTIF A L'AIDE D'URIDINE TRITIÉE, D'UN VIRUS COXSACKIE A 13 CULTIVÉ SUR CELLULES WI 38

1°) Préparation du stock de COXSACKIEVIRUS A 13 marqué à l'uridine tritiée

Les cellules sont cultivées sur des boîtes de Pétri en plastique (FALCON) de 10 centimètres de diamètre.

Chacune d'elles contient 5×10^6 cellules en phase stationnaire dans 5 ml de milieu 199 de PARKER.

On prépare ainsi 20 boîtes. Chaque boîte est inoculée à l'aide de 1 ml d'une suspension virale de CA 13 titrant sur cellules WI 38 : 5×10^5 doses infectieuses dans 0,1 ml : on obtient ainsi une multiplicité doses infectieuses/cellules de 1/1.

Après un contact virus/cellules de 90 minutes, on lave la nappe cellulaire et l'on rajoute 5 ml de milieu de PARKER contenant 5 microcuries d'uridine tritiée par ml.

Après 3 heures de contact, on lave à nouveau les cellules, on remplace le milieu par 5 ml de milieu frais exempt d'uridine.

On récolte après dégénérescence des cellules en 24 à 48 heures.

On centrifuge la suspension pour éliminer les débris cellulaires à 3.000 tours pendant 10 minutes en centrifugeuse réfrigérée.

Le surnageant constitue l'antigène CA 13 marqué à l'uridine tritiée.

Il est titré d'une part sur cellules ; d'autre part, on en détermine la radio-activité réellement incorporée par la technique de l'acido-insoluble (voir technique en fin de chapitre).

De cette façon, on pourra établir une corrélation entre le titre infectieux du virus et sa radio-activité.

Tous les liquides de lavages cellulaires sont conservés ; on détermine la radio-activité théoriquement absorbée par le virus.

2°) Protocole expérimental (voir schéma n° 2)

A - Adsorption du virus CA 1 sur cellules WI 38

L'expérimentation se fait non pas sur des cellules en phase stationnaire, mais en phase dispersée.

Le milieu dispersant est constitué par le milieu 199 de PARKER.

On prépare 4 lots de tubes à centrifuger, chaque tube contenant 3×10^6 cellules dans 2 ml de milieu.

2 lots serviront de témoins et 2 autres lots d'essais.

Les 2 lots essais sont inoculés par du virus CA 1 dans les conditions que nous décrirons plus loin.

Les 2 lots témoins ne sont pas inoculés par ce virus CA 1.

Les 2 lots essais sont composés :

- d'une série de 5 tubes servant à l'étude de l'adsorption du virus CA 13 marqué, à 37°C, après adsorption du CA 1,
- d'une série de 11 tubes servant à l'étude de l'adsorption à + 4°C du CA 13 marqué, après adsorption du CA 1.

Les 2 lots témoins sont composés :

- d'une série de 5 tubes témoins servant à l'étude de l'adsorption à 37°C du CA 13 marqué.
- d'une série de 11 tubes témoins servant à l'étude de l'adsorption à + 4°C du CA 13 marqué.

Chaque tube des 2 lots essais est inoculé à l'aide de 0,5 ml de suspension de virus CA 1 titrant sur souriceaux nouveau-nés 6×10^5 doses infectieuses dans 0,1 ml, soit une multiplicité virus/cellules de 1/1. On laisse le virus CA 1 s'adsorber pendant 30 minutes à 37°C en agitant fréquemment, puis on centrifuge les cellules ; on les lave 2 fois avec du milieu 199 de PARKER et on les remet en suspension dans 1 ml. de ce même milieu.

Les cellules du lot témoin sont traitées de la même façon (30 minutes à 37°C, centrifugation, lavages, etc...) toutefois, on ne fera pas adsorber sur celles-ci le virus CA 1.

B - Etude de l'adsorption du virus CA 13 marqué à l'uridine tritiée sur cellules témoins et sur cellules "traitées" (*)

a - étude de l'adsorption à 37°C :

La suspension du virus CA 13 marqué sera inoculée à la fois sur les 5 tubes de cellules témoins et sur les 5 tubes de cellules "traitées", à raison de 1 ml de suspension virale titrant 3×10^5 doses infectieuses sur cellules WI 38 par 0,1 ml.

On porte tous ces tubes au bain marie à 37°C en agitant continuellement.

On prélève un tube de cellules témoins et un tube de cellules "traitées" aux temps :

t + 5',
t + 15',
t + 30',
t + 45',
t + 60'.

Au fur et à mesure des prélèvements, les tubes sont centrifugés 3.000 tours 10 minutes.

Les cellules sont lavées 2 fois en milieu 199 de PARKER et remises en suspension dans 2 ml du même milieu.

On congèle tous les surnageants et la suspension cellulaire.

On déterminera sur chaque échantillon la radio-activité par la technique de l'acido-insoluble.

b - Adsorption à + 4°C :

L'opération se fait en 2 temps :

Tout d'abord, on étudie pendant une heure à + 4°C l'adsorption du virus CA 13 marqué, sur cellules témoins et sur cellules "traitées".

Les 11 tubes de cellules témoins et les 11 tubes de cellules "traitées" seront inoculés avec 1 ml de suspension de virus CA 13 marqué, titrant 3×10^5 doses infectieuses par 0,1 ml sur cultures de cellules WI 38.

(*) On appellera "cellules traitées" :

les cellules sur lesquelles on aura préalablement fait adsorber le virus CA 1.

On porte tous les tubes à + 4°C, on prélève un tube témoin et un tube essai aux temps : t + 5',
 t + 15',
 t + 30',
 t + 45',
 et t + 60'.

Chaque tube est centrifugé au moment du prélèvement, les cellules sont lavées deux fois en milieu 199 de PARKER et remises en suspension dans 2 ml de ce même milieu.

Le restant des tubes (6 tubes témoins et 6 tubes essais) est également centrifugé.

Les cellules sont lavées en milieu 199 de PARKER et remises en suspension dans 2 ml de ce même milieu.

Ces 12 tubes sont alors portés au bain marie à 37°C en agitant constamment.

On prélève alors un tube témoin et un tube essai aux temps :
 t + 90',
 t + 2 heures,
 t + 3 heures,
 t + 4 heures,
 t + 5 heures,
 t + 6 heures.

Les tubes prélevés sont centrifugés au fur et à mesure ; les cellules sont lavées 2 fois en milieu 199 de PARKER et remises en suspension dans ce même milieu.

Tous les surnageants sont récupérés et congelés, de même que les suspensions cellulaires.

On en déterminera la radio-activité par la technique de l'acido-insoluble que nous allons décrire.

3°) Technique de détermination de la radio-activité par la méthode de l'acido-insoluble :

On travaille sur une prise d'essai de 100 micro-litres venant des différents échantillons préalablement obtenus.

On précipite 20 minutes dans la glace pilée par 1 ml d'acide trichloracétique à la concentration finale de 10 % en agitant vigoureusement.

A cette prise d'essai, on ajoute 0,5 ml d'une solution d'albumine bovine à la concentration de 1 mg/ml dans le cas où il n'y aurait pas de précipité par l'acide.

On centrifuge à 2.000 tours pendant 20 minutes.

On sèche le culot, on ajoute 0,05 ml d'acide formique, on laisse hydrolyser 10 minutes à 37°C.

On ajoute alors 10 ml de liquide scintillant dont la composition est la suivante :

- Naphtalène : 100 g
- Diphényl 2,5 oxazole : 5 g
-
- Dioxan : q.s.p. 1 litre.

Chaque échantillon est passé dans un compteur à scintillation afin d'en déterminer la radio-activité.

CHAPITRE DEUXIEME

ETUDE DE LA SENSIBILITE DE DIFFERENTS SYSTEMES
CELLULAIRES AUX COXSACKIEVIRUS A

Dans un premier paragraphe, nous allons rappeler brièvement quelles sont les cellules dont nous avons voulu apprécier la sensibilité et quels sont les antigènes COXSACKIEVIRUS A utilisés pour mettre en évidence la sensibilité des diverses cellules.

1°) Matériel viral et cellulaire utilisés

a - Les cellules

Quatre sortes de cellules ont été utilisées :

- Les cellules thyroïdiennes humaines en culture primaire,
- La première subculture des cellules précédentes,
- La lignée WI 38 de fibroblastes humains embryonnaires,
- La lignée Am 57 de cellules amniotiques humaines.

b - Le matériel viral

Trois sortes de suspension virale COXSACKIE A ont été essayées dans notre travail.

- d'une part, nous avons utilisé des souches multipliées sur souches nouveaux-nés, souches prototypes venant du Service du Docteur VON MAGNUS (COPENHAGUE), elles constituent le GROUPE I : types CA 1 à CA 22, et CA 24.
- d'autre part, des souches prototypes adaptées aux cellules amniotiques primaires, envoyées par le Docteur MELNICK (HOUSTON) : elles constituent le GROUPE II.

Les types suivants ont été essayés : - CA 2 à CA 4,
- CA 7 à CA 18,
- CA 20 à CA 21,
- CA 24.

Les types antigéniques : CA 1, CA 5, CA 6, CA 19 et CA 22 n'ont pu l'être car ils n'ont à ce jour pas été adaptés aux cellules amniotiques primaires.

- enfin, nous avons utilisé également des souches (GROUPE III) non typées pour la plupart, ou identifiées pour quelques unes d'entre elles en fixation du complément, souches isolées sur souriceaux nouveau-nés, à partir de selles de malades et soupçonnées être des COXSACKIEVIRUS A puisque, inoculées aux souriceaux nouveau-nés, elles provoquaient chez ceux-ci les signes de paralysie flasque des membres postérieurs caractéristiques d'une infection à COXSACKIEVIRUS A.

De toute façon, quelque soit la suspension virale utilisée, nous avons admis qu'après trois passages aveugles, un type antigénique qui ne donnait pas d'effet cytopathique sur cellules n'était pas adaptable à cette cellule.

Par contre, si un effet cytopathique apparaissait, un quatrième passage était réalisé et la récolte de ce passage, congelée, était utilisée pour l'identification des souches non typées.

2°) Résultats obtenus et discussion

a - GROUPE I : Souches prototypes adaptées aux souriceaux

Nous avons résumé dans le tableau n° 3, les résultats observés après trois passages des suspensions virales obtenues par broyage des carcasses de souriceaux prototypes.

- Résultats obtenus sur cellules thyroïdiennes primaires et leur première subculture :

Dix types antigéniques ont pu être adaptés à ces deux cellules.

Ce sont les types :

CA 7, CA 9, CA 11, CA 13, CA 14, CA 15, CA 18, CA 20, CA 21, CA 24.

Toutefois, pour ces deux systèmes cellulaires, il nous est apparu qu'il était nécessaire d'utiliser des cultures jeunes, à savoir, 24 à 48 heures après leur mise en culture.

En effet, utilisées dans ces conditions, l'effet cytopathique est très net et ne peut passer inaperçu.

Si, au contraire, on utilise ces cellules après 48 heures, on obtient très souvent un effet cytopathique partiel où l'on ne voit qu'un petit nombre de cellules atteintes, alors qu'il subsiste un très grand nombre de cellules normales.

Si on ne prend pas la précaution de lire les cellules tous les jours, l'effet cytopathique partiel passe alors inaperçu.

De plus, la population cellulaire qui semble atteinte est constituée essentiellement de cellules épithéliales alors que les cellules fibroblastiques semblent insensibles.

- Résultats obtenus sur cellules WI 38.

Les dix types antigéniques qui avaient été adaptés aux cellules thyroïde sont les mêmes qui ont pu l'être sur cellules WI 38.

- Résultats obtenus sur cellules Am 57.

Les mêmes résultats que ceux observés pour les cellules thyroïdiennes et WI 38 sont obtenus pour ces cellules.

b - GROUPE II : Souches prototypes

Le tableau n° 4 nous indique les types antigéniques COXSACKIE A que nous avons pu adapter aux différents systèmes cellulaires après trois passages.

- Résultats obtenus sur cellules thyroïde et leur subculture :

Dix souches sur dix-huit ont pu être adaptées sur ces deux cellules ; ce sont les mêmes que celles adaptables à partir des broyats de souriceaux :

CA 7, CA 9, CA 11, CA 13, CA 14, CA 15, CA 18, CA 20, CA 21, CA 24.

- Résultats obtenus sur cellules WI 38 :

Cette cellule nous a permis d'adapter deux types antigéniques supplémentaires, CA 10 et CA 16, soit 12 types antigéniques sur 18.

- Résultats obtenus sur cellules Am 57 :

Les résultats obtenus sur cette cellule sont strictement identiques à ceux que nous avons décrits sur cellules thyroïdiennes.

En conclusion : il semble donc bien que la cellule WI 38 soit plus sensible que les deux autres ; nous allons voir dans le paragraphe suivant que cette cellule nous a permis d'adapter le plus grand nombre de COXSACKIEVIRUS A isolés de selles de malades.

c - GROUPE III : Souches isolées sur souriceaux nouveaux-nés provenant de selles de malades.

Les tableaux n° 5, 5 bis, nous montrent les résultats obtenus après trois passages sur les différentes cellules.

- Résultats obtenus sur cellules thyroïde et leur subculture :

Après trois passages sur ces deux types cellulaires, nous avons pu adapter 13 souches sur les 41 testées, soit 31,7 %.

Rappelons que pour avoir la plus grande chance d'adapter un COXSACKIEVIRUS A à ces cellules, il nous a fallu travailler sur des cultures jeunes, âgées au plus de 48 heures.

- Résultats obtenus sur cellules WI 38 :

20 souches sur 41 (soit : 49 %) ont pu être adaptées après trois passages.

Notons que parmi ces 20 souches se trouvent les 13 souches que nous avons pu adapter sur cultures primaires de cellules thyroïde et que, par conséquent, la cellule WI 38 a permis d'en adapter 7 de plus.

- Résultats obtenus sur cellules Am 57 :

Cette cellule nous a permis d'adapter 12 souches sur 41 soit 29,3 % des souches.

Ces 12 souches sont également celles que nous avons pu adapter sur cellules thyroïde primaires.

En conclusion, il apparaît donc que la cellule la plus sensible aux COXSACKIEVIRUS A est la cellule WI 38 (parmi les 4 types cellulaires que nous avons testés) puisqu'elle nous a permis d'adapter d'une part, le plus grand nombre de prototypes de COXSACKIEVIRUS A et d'autre part, le plus grand nombre de souches isolées de selles de malades.

Cette cellule étant d'une culture très facile, étant également bien résistante, il nous a été possible d'identifier les souches par la technique de neutralisation sur cellules décrites dans le chapitre "MATÉRIEL et MÉTHODES".

3°) Identification par la technique de neutralisation sur cellules WI 38, des souches isolées sur souriceaux nouveau-nés provenant de selles de malades.

Avant d'être neutralisées, ces souches ont été titrées sur cellules WI 38.

Le tableau n° 6 nous indique leur titre.

La neutralisation de chacune d'elles a été pratiquée contre les 23 antisérums spécifiques.

Le tableau n° 6 nous indique les types antigéniques des différentes souches adaptées à la cellule WI 38.

Nous avons ainsi identifié :

12 CA 13 sur 20 souches soit 60 % des souches,
4 CA 10 sur 20 souches soit 20 % des souches,
1 CA 15 sur 20 souches soit 5 % des souches.

3 souches n'ont pu être identifiées ; nous avons de bonnes raisons de penser qu'il s'agit là d'un mélange de 2 virus dont l'un serait un COXSACKIE A.

CHAPITRE TROISIEME

ETUDE DU COMPORTEMENT EN CHROMATOGRAPHIE DE 2 TYPES DE COXSACKIE A : TYPES A 1 et A 13

1°) Suspensions virales utilisées

a - Suspension virale COXSACKIE A 1 :

Cette suspension est préparée sur souriceaux nouveau-nés selon la technique décrite dans le chapitre "MATERIEL et METHODES". Le titrage de cette suspension est pratiqué sur souriceaux nouveau-nés.

Le titre infectieux est alors :

10^6 doses infectieuses/sur souriceaux dans 0,1 ml.

b - Suspension virale COXSACKIE A 13 :

Deux sortes de suspensions virales sont utilisées pour ce même type antigénique :

- L'une préparée sur souriceaux nouveau-nés est titrée d'une part sur ce même type cellulaire après trois passages et d'autre part sur cellules WI 38 (puisque ce type antigénique a été adapté à cette cellule).

Sur souriceaux nouveau-nés, le titre infectieux est de :

$3,2 \times 10^6$ doses infectieuses/souriceaux dans 0,1 ml.

Sur cellules WI 38, il est de :

10^4 doses infectieuses/sur cellules WI 38 dans 0,1 ml.

- L'autre suspension virale CA 13 est préparée par adaptation sur cellules WI 38 de la suspension virale CA 13 préparée sur souriceaux nouveau-nés.

La culture des cellules WI 38 se fait en flacons plastiques (FALCON) de 250 ml.

On récolte après 3 passages sur cette cellule. Le virus est congelé à moins 20°C et conservé à cette température.

La suspension virale ainsi préparée est titrée sur 2 systèmes différents :

- le souriceau nouveau-né : son titre infectieux est de :

4×10^5 doses infectieuses/souriceaux dans 0,1 ml.

- La cellule WI 38 : son titre est alors de :

$6,76 \times 10^5$ doses infectieuses/cellules WI 38 dans 0,1 ml.

En résumé, nous avons chromatographié les suspensions virales suivantes :

Une suspension CA 1 préparée sur souriceaux nouveau-nés,

Deux suspensions CA 13 préparées à partir de la même souche :

- l'une sur souriceaux nouveau-nés après 3 passages,
- l'autre sur cellules WI 38 après 3 passages, à partir du broyat des souriceaux, précédemment préparé.

La détermination du titre infectieux des différents éluats de chromatographie des suspensions virales CA 13 préparées sur cellules et sur souriceaux nouveau-nés se fait sur cellules WI 38 et sur souriceaux nouveau-nés ; celle du CA 1 ne peut se faire que sur souriceaux.

2°) Diagramme d'élution des différentes suspensions virales

Nous avons représenté dans les tableaux n° 7, 8, 9, 10 et 11 les résultats des titrages des différents éluats, et nous avons exprimé dans ces mêmes tableaux le pourcentage d'élution des suspensions virales en fonction de chaque molarité de l'éluant.

Dans les figures n° 12, 13 et 14, nous avons juxtaposé les différents diagrammes d'élution des suspensions virales afin de pouvoir les comparer.

3°) Résultats

Une première constatation peut être faite.

Quelle que soit la suspension virale que nous avons chromatographiée, le pourcentage de virus fixé sur le précipité de phosphate de calcium est pratiquement de 100 %.

Toute la population virale est adsorbée sur ce précipité.

A l'aide des figures n° 12 et 13, nous allons essayer de comparer entre eux les diagrammes d'élution des différentes suspensions virales.

a - Comparaison des titres obtenus pour les éluats d'une suspension virale, lorsque ces éluats sont titrés sur deux systèmes différents :

Dans la figure n° 12, nous avons juxtaposé les diagrammes d'élution de la chromatographie de la suspension virale CA 13 préparée par adaptation sur cellules WI 38, dont les éluats sont titrés, soit sur cellules WI 38 soit sur souriceaux nouveau-nés.

Dans la figure n° 13, nous avons établi la comparaison entre les diagrammes d'élution de la suspension virale CA 13 préparée sur souriceaux nouveau-nés dont les éluats de chromatographie sont titrés, d'une part sur cellules WI 38, d'autre part sur souriceaux nouveau-nés.

Nous ne notons pas de différence essentielle dans l'allure générale des deux diagrammes.

Pour une même suspension virale, le fait de titrer les éluats de chromatographie sur deux systèmes différents n'entraîne pas de variations importantes dans l'allure générale des diagrammes d'élution.

b - Etude du comportement en chromatographie d'une suspension virale CA 13 préparée à partir de broyat de souriceaux et de la même suspension virale obtenue par adaptation du broyat à un système cellulaire :

A l'aide de la figure n° 14, nous allons essayer de mettre en évidence la différence entre les deux diagrammes d'élution.

Dans ce tableau, nous n'avons retenu que les fractions intéressantes, c'est-à-dire les fractions n'ayant pas un pourcentage d'élution nul. Ce sont les fractions : IV, V, VI, VII, VIII et IX (en effet le pourcentage d'élution correspondant aux fractions I, II, III est toujours nul). Nous constatons que le fait d'adapter un broyat de souriceaux CA 13 à un système cellulaire (WI 38) entraîne en chromatographie une perte de la fraction VI.

En effet, le pourcentage d'élution de cette fraction est de 63 % pour l'antigène broyat de souriceaux alors qu'il est pratiquement nul pour l'antigène cellulaire.

Au contraire, nous constatons un gain de la fraction VII ; en effet son pourcentage d'élution se trouve nettement augmenté par adaptation du CA 13 broyat de souriceaux à la cellule.

Ainsi ce pourcentage qui est de 30 % pour l'éluat de la chromatographie de la suspension de CA 13 broyat de souriceaux, s'élève à 55 % après adaptation à la cellule.

Remarquons également que si nous titrons les éluats de chromatographie du virus CA 13 (broyat de souriceaux) sur souriceaux nouveau-nés, le pourcentage d'élution maximum dans la fraction VI est de 72 % (figure n° 13) alors qu'il n'est plus que de 63 % dans la fraction VI de la chromatographie du même antigène (figure n° 13) titré sur cellules WI 38.

Or, le fait de titrer cette fraction VI (broyat de souriceaux) sur cellules correspond à un passage et montre bien que cette fraction est une bonne fraction pour le développement du virus sur souriceaux mais qu'elle s'avère très mauvaise pour son développement sur cellules.

Nous avons pu d'ailleurs reproduire ce fait en utilisant la fraction VI venant de la chromatographie de la suspension virale CA 13 préparée sur souriceaux, en lui faisant subir trois passages sur cellules WI 38.

Chaque passage a été titré sur cellules WI 38, ce qui nous a permis d'observer une diminution importante du titre infectieux de chacun des passages.

Ainsi, au bout du troisième passage, cette diminution est de l'ordre de 99 %.

En ce qui concerne la fraction VII :

Nous pouvons constater que le pourcentage d'élution de la fraction VII de la chromatographie du virus CA 13 (broyat de souriceaux) est de 30 % (figure n° 14) alors que ce pourcentage est de 55 % (figure n° 14) après adaptation à la cellule.

De plus, lorsque nous titrons les éluats de la chromatographie de l'antigène CA 13 (broyat de souriceaux) sur souriceaux, le pourcentage d'élution de la fraction VII est de 3,2 % alors qu'il est de 30 % lorsque nous titrons cette fraction sur cellules WI 38 (ce qui correspond en fait à un passage sur cellules).

Ceci montre bien que cette fraction semble être celle qui est favorable à l'adaptation du CA 13 au système cellulaire WI 38.

c - Etude du comportement en chromatographie d'une suspension virale de CA 1 préparée à partir de broyat de souriceaux.

Le tableau n° 11 nous indique le résultat des titrages des différents éluats de cette chromatographie effectués sur souriceaux nouveau-nés. Dans la figure n° 14, nous avons juxtaposé les résultats de cette chromatographie à ceux des chromatographies des suspensions virales CA 13 (broyat de souriceaux) et CA 13 (antigène cellulaire)

Une différence notable apparaît alors :

l'absence de cette fraction VII à laquelle nous avons précédemment attribué le pouvoir d'adaptation au système cellulaire WI 38, du CA 13 préparé sur souriceaux nouveau-nés.

La suspension virale CA 1 contient bien les fractions V et VI mais nous avons vu que ces fractions étaient mauvaises pour le développement du virus CA 13 sur cellules.

La chromatographie nous permet donc de mettre en évidence une différence dans la composition antigénique des particules présentes dans la suspension globale du virus CA 1 et du virus CA 13, en particulier l'absence d'une population antigénique correspondant à la fraction VII en ce qui concerne la suspension virale CA 1, fraction qui permet l'adaptation de la suspension virale CA 13 à la cellule WI 38 et dont l'absence dans la suspension virale CA 1 expliquerait que ce virus ne puisse s'adapter à cette cellule.

CHAPITRE QUATRIEME

ETUDE DE L'ADSORPTION DES VIRUS COXSACKIE A SUR CELLULES Am 57

A - ESSAIS DE MODIFICATION DES RECEPTEURS DE LA MEMBRANE CELLULAIRE

1°) Matériel viral

Dans cette étude, nous avons utilisé comme type de virus COXSACKIE A le CA 1 choisi parmi les autres types comme étant un type non encore adapté à un système cellulaire in vitro.

La suspension virale utilisée provient du broyage de souriceaux nouveau-nés.

Cette suspension virale a été titrée sur ce système et le titre obtenu est de :

10^6 doses infectieuses/0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés.

Cette suspension nous servira tout au long de ce travail.

2°) Matériel cellulaire

Nous avons utilisé comme système cellulaire la lignée Am 57.

Ces cellules ont été utilisées non pas en phase stationnaire, mais en phase dispersée.

Ainsi, après trypsination, les cellules sont remises en suspension dans le milieu de survie constitué par le milieu 199 de PARKER, additionné de 2 % de sérum foetal et de 0,1 % d'un mélange Pénicilline/Streptomycine.

3°) Protocole expérimental

Les cellules en suspension sont ainsi inoculées avec la suspension virale de CA 1.

On adopte une multiplicité virus/cellules de 1/1.

Le contact entre les particules virales et les cellules se fait à deux températures différentes :

- d'une part au bain marie à 37°C,
- d'autre part à + 4°C

De façon à obtenir un contact fréquent entre les particules virales et les cellules, le mélange virus/cellules est agité le plus fréquemment possible.

On laisse l'adsorption se faire pendant une heure.

On dispose de deux séries de 4 tubes à hémolyse.

Chaque tube contient : 2×10^6 cellules en suspension dans 1 ml de milieu de survie.

Chaque tube est inoculé avec 0,2 ml de la suspension virale CA 1 titrant 10^6 doses infectieuses/0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés.

- une série de 4 tubes est portée au bain marie à 37°C,
- une série de 4 tubes est portée à + 4°C.

On agite fréquemment.

On prélève 2 tubes (un tube à + 4°C et un tube à + 37°C) aux temps :

- t + 5',
- t + 15',
- t + 30',
- t + 60'.

On centrifuge les cellules à 3.000 tours pendant 10 minutes ; on récupère le surnageant qui est titré sur souriceaux nouveau-nés.

Le titrage se fait en inoculant une portée de 10 souriceaux par dilution, chaque souriceau est lui-même inoculé avec 0,1 ml de surnageant viral.

Pour déterminer le titre au temps t 0, on titre une suspension virale contenant 0,2 ml de la suspension CA 1 (titrant 10^6 doses infectieuses dans 0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés) dans 1 ml de milieu de survie utilisé pour la mise en suspension des cellules Am 57.

En fait, s'il y a adsorption du virus CA 1 sur les cellules Am 57, le titre des différents surnageants aux différents temps de prélèvements doit diminuer par rapport au titre initial.

Sinon, il restera pratiquement le même.

Ce protocole expérimental a été utilisé de la même manière au cours des différents essais ;

En effet, nous avons également tenté de faciliter l'adsorption du virus CA 1 en utilisant des artifices divers.

Ainsi :

- l'utilisation d'agents chimiques destinés à modifier la paroi du virus ou des cellules tels :
 - . la vitamine A,
 - . le DEAE Dextran,
- l'utilisation d'un "helper" (ici le virus polio I) destiné à faciliter l'adsorption et la pénétration du CA 1 en modifiant les sites d'attachements cellulaires.

4°) Résultats des différents essais

a - Adsorption sur cellules Am 57 :

Le tableau n° 15 résume les résultats des différents titrages des surnageants au cours de l'étude de l'adsorption à + 37°C et à + 4°C.

Au temps t_0 , le titre est de :

2×10^5 dans 0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés à $+ 4^\circ\text{C}$ et
 $2,1 \times 10^5$ à 37°C .

Aux temps : $t + 5'$,
 $t + 15'$,
 $t + 30'$,
 $t + 60'$,

on ne note pas de différences significatives dans le titre des divers surnageants, ce qui indique que l'adsorption du virus sur les cellules est pratiquement nulle ou si faible que la sensibilité de la technique de titrage sur souriceaux nouveau-nés est insuffisante pour pouvoir la détecter.

b - Adsorption du virus CA 1 sur cellules Am 57 en présence de vitamine A :

Nous n'avons étudié ici que l'adsorption à 37°C .

Deux techniques ont été utilisées :

- d'une part, le traitement des cellules par la vitamine A (*),
- d'autre part, le traitement du virus

La première opération a été de déterminer la concentration en vitamine A tolérable par les cellules. Car une concentration trop élevée en vitamine A en solution provoque sur les cellules un effet toxique dû certainement à l'excipient nécessaire à la solubilisation de la vitamine. Pour ce, les cellules ont été mises en culture avec des concentrations croissantes de vitamine A ; la concentration adoptée est la plus grande qui ne donne pas d'effet toxique sur les cellules Am 57.

Cette concentration est de l'ordre de 5.000 U.I./ml.

- Dans un premier essai, on inocule le virus CA 1 sur les cellules en même temps que l'on introduit la suspension de vitamine A à la concentration de 5.000 U.I./ml.

L'inoculum viral est de 0,2 ml de la suspension virale de CA 1 titrant 10^6 doses infectieuses par 0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés.

Quant à la vitamine A, on introduit 0,1 ml d'une solution à 50.000 U.I./ml, obtenue par dilution au 1/3 de la suspension de vitamine A (AROVIT ROCHE).

- Dans un second essai, on ajoute la vitamine A à la même concentration et sous le même volume, 3 heures avant l'inoculation du virus.
- Dans un troisième essai, on fait un contact entre le virus et la vitamine A pendant 1 heure à 37°C (0,2 ml du virus titrant 10^6 doses infectieuses dans 0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés + 0,1 ml

(*) La vitamine A est présentée sous forme de suspension dosée à 150.000 U.I./ml. Il s'agit d'AROVIT du laboratoire ROCHE.

d'une suspension de vitamine A contenant 50.000 U.I./ml).

Le protocole expérimental est le même que précédemment.

Le tableau n° 16 indique les résultats obtenus.

On constate que là encore, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence aux différents temps de prélèvements.

c - Adsorption en présence de DEAE DEXTRAN

L'adsorption n'a été étudiée qu'à 37°C.

Dans cette étude, nous avons également adopté le même protocole que pour la vitamine A, à savoir :

un essai d'adsorption du CA 1 sur cellules Am 57, en présence de DEAE Dextran à la concentration de 100 microgrammes par ml.

Cette concentration a été déterminée comme étant la concentration maxima qui ne provoquait pas d'effet toxique sur cellules Am 57.

Nous avons introduit le DEAE Dextran en même temps que le virus dans un premier temps.

Dans un second temps, nous l'avons introduit 3 heures avant le virus.

Enfin, dans un troisième temps, nous avons inoculé sur les cellules un mélange virus/DEAE Dextran (0,2 ml de virus titrant 10^6 doses infectieuses dans 0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés + 0,1 ml d'une solution de DEAE Dextran à la concentration de 1.000 microgrammes par ml après contact d'une heure à 37°C).

Les surnageants ont été titrés sur souriceaux nouveau-nés.

Le tableau n° 17 résume les résultats obtenus.

Nous n'avons pas noté d'action favorisante du DEAE Dextran au cours de l'adsorption du virus, qu'il soit ajouté avant, en même temps que le virus ou après contact d'une heure à 37°C avec celui-ci.

d - Utilisation du polio virus 1 comme "Helper" favorisant l'adsorption du CA 1 sur cellules Am 57.

Les cellules Am 57 sont permissives au virus polio 1.

Le but de la manipulation est de faire adsorber sur les cellules Am 57 le virus polio 1 à une concentration telle que la multiplicité virus/cellules soit de : 1/1, puis après élimination du virus polio 1 non fixé, c'est-à-dire par centrifugation des cellules, d'introduire le virus CA 1 à une concentration telle que la multiplicité virus/cellules soit de 1/1, enfin de déterminer par le titrage des surnageants aux différents temps de prélèvements, si le virus polio a favorisé l'adsorption du CA 1.

- Adsorption du polio 1 :

Le virus polio 1 utilisé titre 2×10^6 doses infectieuses dans 0,1 ml sur cellules Am 57.

On inocule 4 tubes à hémolyse contenant 2×10^6 cellules Am 57 dans 1 ml de milieu de survie, avec 0,1 ml de la suspension de virus polio 1.

On laisse en contact pendant une heure à 37°C.
Puis on centrifuge les cellules et l'on reprend le culot cellulaire dans 1 ml d'un milieu de survie.

- Adsorption du virus CA 1 :

Les 4 tubes sont alors inoculés avec le virus CA 1 à raison de 0,2 ml de la suspension titrant 10^6 doses infectieuses dans 0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés.

On porte les tubes à 37°C et on prélève un tube aux temps :

t + 5',

t + 15',

t + 30',

t + 60'.

Chaque prélèvement est centrifugé à 3.000 tours pendant 10 minutes et on titre les surnageants sur souriceaux nouveau-nés ;

le tableau n° 18 nous résume les résultats obtenus.

On constate que le virus polio 1 utilisé comme "Helper" n'a pas favorisé l'adsorption et par conséquent la pénétration du virus CA 1.

En conclusion de ce paragraphe, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une adsorption du CA 1 sur cellules Am 57, même en utilisant des artifices tels que :

- La vitamine A,
- Le DEAE Dextran et un
- Helper comme le polio virus 1.

B - RECHERCHE D'INHIBITEURS EVENTUELS EMPECHANT L'ADSORPTION DES COXSACKIE VIRUS SUR CELLULES :

Nous avons recherché ces inhibiteurs éventuels à deux niveaux différents :

- d'une part dans les broyats de souriceaux car on peut penser que ces broyats de souriceaux sains sont peut-être inhibiteurs vis-à-vis des virus COXSACKIE A.
- d'autre part dans les milieux mêmes servant à la croissance des cellules et plus particulièrement dans le sérum de veau qui entre fréquemment dans la composition de ces milieux.

1°) Recherche d'un éventuel inhibiteur dans les broyats de souriceaux :

Pour ce, nous avons utilisé comme matériel viral un virus COXSACKIE A se multipliant sur cellules Am 57 : le CA 13.

La technique de mise en évidence de l'inhibiteur est assez simple : Nous avons titré la suspension de CA 13 au préalable sur cellules Am 57.

Puis cette suspension a été titrée après un contact de 2 heures à + 4°C avec un broyat de souriceaux sains préparé comme cela est décrit dans le chapitre "MATÉRIEL et MÉTHODE".

Le contact se fait en mélangeant :

0,5 ml de la suspension virale à 0,5 ml de la suspension de broyat.

On inocule 0,1 ml du mélange sur des tubes de culture de cellules Am 57.

On laisse s'adsorber pendant une heure à 37°C le virus.

On lave chaque tube avec le milieu de HANKS et l'on ajoute alors le milieu de survie, constitué par le milieu 199 de PARKER contenant 2 % de sérum foetal.

Le titre de la suspension avant le contact est de :

$10^{-5,16}$ DICT 50 dans 0,1 ml sur cellules Am 57.

Le titre du virus après contact avec le broyat de souriceaux est de :

$10^{-4,83}$ DICT 50 dans 0,1 ml sur cellules Am 57 compte tenu de la dilution apportée par le contact.

On ne peut conclure à un effet inhibiteur du broyat de souriceaux.

On se trouve en fait dans les limites d'erreurs de la technique de titrage.

2°) Recherche des inhibiteurs contenus dans les sérums de veau utilisés dans les cultures de cellules.

Nous avons également pensé que les COXSACKIE A pouvaient ne pas s'adsorber parce qu'ils en étaient empêchés par les inhibiteurs non spécifiques contenus dans les sérums.

Nous appuyant sur les propriétés du kaolin décrites par MANN (1967) et son équipe qui éliminent les inhibiteurs non spécifiques des sérums utilisables en inhibition d'hémagglutination et sur la technique de OKER-BLOM (1952) qui purifie les COXSACKIEVIRUS par la bentonite, nous avons employé ces deux composés chimiques pour éliminer les inhibiteurs spécifiques du sérum de veau et pour purifier les COXSACKIEVIRUS A.

Dans un premier temps, nous avons traité les sérums à l'aide d'une suspension de kaolin à 25 % en eau distillée stérile à volume égal avec le sérum.

Après contact de 2 heures à + 4°C, on centrifuge à 3.000/10 minutes.

On décante et l'on récupère le surnageant que l'on utilise à une concentration double de celle utilisée normalement dans les milieux de culture de cellules.

Le sérum est décomplémenté une heure à 56°C avant usage.

La suspension de CA 13 est elle-même traitée à la bentonite.

On prépare une solution de bentonite à 1 %, on fait un contact entre un volume de cette solution et un volume de la suspension de CA 13 ;

le contact dure 30 minutes à + 4°C en agitant souvent, on centrifuge à 3.000 tours/5 minutes et l'on décante le surnageant que l'on récupère.

On va titrer la suspension virale non traitée d'une part sur les cellules Am 57 cultivées avec un milieu contenant le sérum de veau traité par le kaolin et d'autre part sur les cellules cultivées avec un milieu contenant du sérum de veau non traité.

Le tableau n° 19 nous donne les résultats des différents titrages. Nous voyons d'après ces tableaux que ni le fait de traiter les virions ni celui de traiter les sérums n'apportent de différence dans le titre de la suspension virale.

C - RECHERCHE D'UNE EVENTUELLE INTERFERENCE ENTRE DEUX COXSACKIEVIRUS A

Si l'on suppose qu'un virus est capable de s'adsorber sur une cellule, d'y pénétrer sans donner d'effet cytopathique apparent, on peut révéler sa présence intra-cellulaire en inoculant sur les cellules un autre virus pour lequel la cellule est permissive et sur laquelle ce virus donnera un effet cytopathique.

C'est ce que l'on sait pour le virus de la rubéole dont on révèle la présence dans les cellules WI 38 à l'aide d'un virus de la famille des Entérovirus.

Si le virus de la rubéole que l'on veut identifier est présent dans les cellules, le virus interférant ne donnera pas d'effet cytopathique dans cette cellule.

Si au contraire, le virus de la rubéole ne se trouve pas dans la cellule, alors, le virus interférant pourra se multiplier dans la cellule et provoquer un effet cytopathique.

Ceci nous a conduit à utiliser un virus interférant pour vérifier si le virus CA 1 s'adsorbe ou non sur les cellules WI 38.

Nous avons utilisé comme virus le virus CA 13 qui fait partie de la même famille que le CA 1.

Or, nous avons vu que la cellule WI 38 est permissive pour le CA 13.

Du point de vue technique, on pratique sur cellules WI 38 réparties en couche monocellulaire en FALCON de 250 ml un contact de 0,1 ml de la suspension de CA 1 titrant 2×10^6 doses infectieuses/0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés.

On disperse $2,8 \times 10^6$ cellules WI 38 par FALCON de façon à avoir une multiplicité virus/cellules de 1/1.

Le contact se fait pendant une heure à $+ 37^\circ\text{C}$. Au bout d'une heure, on lave les cellules avec le milieu de HANKS et l'on inocule sur les cellules 0,1 ml de la suspension de CA 13 titrant 2×10^6 doses infectieuses/0,1 ml sur cellules WI 38.

On fait un témoin en inoculant une seconde FALCON avec 0,1 ml de la suspension de CA 13 sans que les cellules aient été au préalable mises en contact avec la suspension de CA 1.

On examine les cellules tous les jours et l'on note l'effet cytopathique, s'il existe.

Au cours de cette expérience, nous avons pu constater qu'il y avait un retard de l'effet cytopathique dans la FALCON "Essai", retard que l'on peut estimer à 72 heures par rapport à la FALCON "Témoin".

Nous avons d'ailleurs recommencé cette expérience deux autres fois et confirmé ce que nous avons vu la première fois.

Cette constatation nous a fait penser que peut-être le virus CA 1 n'était pas aussi indifférent vis-à-vis de la cellule WI 38 que nous le pensions.

C'est pourquoi nous avons voulu préciser ces faits en utilisant une suspension de virus CA 13 marquée à l'uridine tritiée afin de pouvoir suivre la cinétique d'adsorption des virions CA 13 sur cellules WI 38 normales et sur cellules préalablement mises en contact avec la suspension de CA 1.

D - ETUDE DE L'ADSORPTION SUR CELLULES WI 38 NORMALES ET TRAITEES (*) DU COXSACKIEVIRUS A 13 MARQUE A L'URIDINE TRITIEE

1°) Matériel viral

a - Coxsackie A 1

La suspension de virus CA 1 a été préparée selon la méthode indiquée page 8 dans le chapitre "MATÉRIEL et MÉTHODES". Cette suspension a été titrée sur souriceaux nouveau-nés. Le titre de cette suspension est de :

10^7 doses infectieuses/0,1 ml sur souriceaux nouveau-nés. Cette suspension (à une dilution déterminée pour que la multiplicité virus/cellules soit de 1/1) sera utilisée dans la suite de ce travail.

b - Coxsackie A 13

La suspension de virus CA 13 marquée à l'uridine tritiée est obtenue comme cela est décrit dans le chapitre "MATÉRIEL et MÉTHODES", page 12.

Cette suspension est titrée sur cellules WI 38.

Le titre obtenu est de :

$10^{5,5}$ doses infectieuses dans 0,1 ml sur cellules WI 38. Cette suspension a été également testée en radio-activité.

Le tableau n° 20 nous résume les résultats obtenus pour le marquage radio-actif de la suspension virale du virus CA 13. Les résultats nous montrent que théoriquement la radio-activité totale incorporée par les virions est de :

$1,86 \times 10^8$ (coups par minute).

Nous avons bien entendu déterminé la radio-activité totale réellement incorporée par les virions en mesurant la radio-activité totale de la suspension virale après dégénérescence.

(*) On appellera "cellules traitées" des cellules sur lesquelles on aura préalablement fait adsorber du virus CA 1.

Cette radio-activité totale est de :

$$1,77 \times 10^8 \text{ (coups par minute).}$$

Nous pouvons donc dire que la radio-activité réellement incorporée est pratiquement équivalente à celle théoriquement déterminée, le pourcentage de radio-activité perdue est de :

$$\frac{1,86 - 1,77}{1,86} = \underline{\underline{4,8 \%}}$$

Par la technique de l'acido-insoluble décrite page 15 du chapitre "MATÉRIEL et MÉTHODE", nous avons mesuré la radio-activité incorporée par les acides nucléiques viraux à l'exception de celle incorporée par les nucléotides.

Par cette technique, la radio-activité incorporée est de :

60.850 coups par minute par ml de surnageant viral obtenu par centrifugation à 3.000 tours/10 minutes de la suspension après dégénérescence.

Connaissant le titre de cette suspension, nous pouvons établir un rapport entre son titre infectieux et sa radio-activité.

En effet :

1 ml. de suspension virale correspond à $10^{6,5}$ unités infectieuses soit à 3.200.000 unités infectieuses.

La radio-activité de 1 ml de suspension est de : 60.850 coups par minute.

Nous avons $\left(\frac{3.200.000}{60.850}\right) = 50$ unités infectieuses pour 1 coup par minute.

2°) Matériel cellulaire

La cellule utilisée est la cellule WI 38.

La répartition de la suspension dans les tubes contact se fait comme cela est décrit page 13 du chapitre "MATÉRIEL et MÉTHODES" dans le paragraphe "Protocole Expérimental".

Chaque tube contient 3×10^6 cellules dans 2 ml de milieu.

3°) Résultats

On peut diviser ce paragraphe en deux parties :

l'une consacrée à l'étude de l'adsorption à 37°C et l'autre à + 4°C.

a - Adsorption à 37°C

Le tableau n° 21 résume les résultats obtenus.

Ce tableau indique :

- d'une part les résultats pour les cellules WI 38 témoins et pour les cellules "traitées",
- d'autre part, les résultats pour les surnageants et pour les culots cellulaires en fonction des différents temps de prélèvements.

Le graphe n° I exprime la radio-activité des surnageants et des culots (essai et témoin) en fonction des différents temps de prélèvements. De ce graphe, il ressort plusieurs constatations :

- Suivons tout d'abord l'adsorption du CA 13 marqué à l'uridine tritiée sur cellules normales.

On note au bout de 15 minutes une adsorption maximum puis une élution entre 15 minutes et 30 minutes, élution minime d'ailleurs, et enfin une stabilisation jusqu'à une heure.

Le tableau n° 23 exprime en pourcentage l'adsorption du virus CA 13 marqué sur cellules normales et "traitées".

Le graphe n° II exprime en pourcentage l'adsorption du CA 13 marqué sur les cellules normales et "traitées" en fonction des différents temps de prélèvements.

On note sur ce graphe que l'adsorption maximum à 15 minutes est de 61 % suivie d'une élution faible de l'ordre de 4 à 6 %.

- Si nous considérons maintenant les cellules "traitées", c'est-à-dire les cellules sur lesquelles nous avons préalablement fait adsorber le CA 1, nous constatons dans le graphe n° 1, une légère adsorption entre 0 et 5 minutes puis une quasi stabilisation de la courbe jusqu'à 45 minutes, enfin une forte adsorption entre 45 et 60 minutes.

Considérons le graphe n° I, nous voyons qu'entre 0 et 5 minutes l'adsorption est de l'ordre de 16 %, qu'entre 5 et 45 minutes, elle est de l'ordre de 16 à 26 %, qu'entre 45 et 60 minutes l'adsorption s'accroît intensément pour atteindre 51 % en une heure.

Si nous regardons maintenant les culots cellulaires, nous voyons des courbes symétriques aux premières courbes concernant les surnageants (courbes en miroir).

En effet :

Lorsque la radio-activité décroît dans les surnageants, elle augmente dans les culots et vice-versa.

De ces observations, il ressort une très nette différence entre l'adsorption sur cellules normales et sur cellules "traitées" du virus CA 13 marqué.

En effet, le pourcentage maximum d'adsorption sur cellules normales se situe au temps 15 minutes alors qu'il se situe au temps + 60 minutes sur cellules "traitées" ; il y a retard de l'adsorption sur cellules "traitées" du virus CA 13 marqué ce qui pourrait s'expliquer par le fait que le virus CA 1 s'adsorbe sur les cellules WI 38 gênant par blocage des sites récepteurs l'attachement du virus CA 13 ; puis, il y aurait élution du virus CA 1 qui ne pénétrerait pas dans les cellules, et adsorption retardée du virus CA 13.

Il semble donc bien, et c'est ce que nous voulions montrer, que le virus CA 1 s'adsorbe sur les cellules WI 38.

b - Adsorption à +4°C

Dans ce travail, nous avons reproduit la même expérience que précédemment, mais à + 4°C pendant une heure puis à 37°C pendant six heures. Les résultats ont été résumés dans le tableau n° 22.

Les pourcentages d'adsorption sont exprimés dans le tableau n° 24.

Les graphes n° III et III' expriment la radio-activité des surnageants et des culots cellulaires (essai et témoin) en fonction des différents temps de prélèvement.

Les graphes n° IV et IV' expriment le pourcentage d'adsorption du virus CA 13 marqué, sur cellules normales et sur cellules "traitées".

On constate à la vue des graphes n° III, III', IV et IV' que le maximum d'adsorption du virus CA 13 marqué, à + 4°C, sur cellules normales, se situe à 15 minutes. : il est de 43,9 %.

Ce pourcentage reste stable jusqu'à la fin de la première heure, puis, dès que l'on porte les tubes à 37°C, il passe à 55,4 % au temps t + 90 minutes, pour se stabiliser jusqu'à la fin de la sixième heure. En ce qui concerne l'adsorption sur cellules "traitées" du virus CA 13 marqué, on note que son maximum pendant la première heure se situe au temps t + 60 minutes où il est de 34,4 %.

On note donc que l'adsorption se trouve également décalée par rapport à celle du virus CA 13 marqué, sur cellules normales.

En effet, jusqu'au temps t + 45 minutes, cette adsorption varie entre 13,4 % et 14,6 %.

Pendant les 6 heures à 37°C, on note une augmentation de l'adsorption du CA 13 entre 60 et 90 minutes, puis une stabilisation de la courbe jusqu'à la fin de la sixième heure.

Ici encore, il apparaît que le virus CA 1 semble bien s'être fixé à + 4°C sur les récepteurs cellulaires, empêchant momentanément l'adsorption du virus CA 13.

Puis, le virus CA 1 est élué et le virus CA 13 peut alors se fixer sur les récepteurs libérés.

De plus, le fait de porter les mélanges contact virus/cellules à 37°C semble favoriser l'adsorption virale puisque son pourcentage passe de 43,31 % au temps t + 60 minutes à 55,41 % au temps t + 90 minutes en ce qui concerne les cellules témoins, et de 34,39 % au temps t + 60 minutes à 55,41 % au temps t + 90 minutes pour les cellules "traitées".

Ceci prouverait qu'une partie au moins des virions aurait une adsorption thermosensible.

En résumé :

Nous étions partis du point de vue que peut-être le virus CA 1 s'adsorbait sur les cellules WI 38 et ne pénétrait pas dans cette cellule : par l'intermédiaire du virus CA 13 marqué à l'uridine tritiée nous montrons qu'il semble bien que le virus CA 1 est capable de se fixer sur les récepteurs cellulaires mais toutefois qu'il ne pénètre pas dans la cellule.

CHAPITRE CINQUIEME

DISCUSSION

Nous envisagerons cette discussion en trois parties :

La première aura trait aux problèmes pratiques posés par l'isolement sur culture de tissu des COXSACKIEVIRUS A, problèmes que nous exposerons dans les Chapitres I et II.

La seconde partie envisagée dans cette discussion, exposée dans les Chapitres III et IV aura trait aux problèmes fondamentaux que posent les COXSACKIEVIRUS du groupe A.

La troisième partie sera consacrée à un bref énoncé de nos hypothèses de travail actuel ; elle sera résumée dans le Chapitre V.

I - PROBLEMES POSES PAR L'ISOLEMENT DES COXSACKIEVIRUS A SUR CULTURE DE TISSU.

Le fait même que l'on ignore beaucoup de choses sur les problèmes cliniques et épidémiologiques posés par ces virus est dû essentiellement à ce que leur isolement sur cellules est difficile, voire impossible pour le moment, en ce qui concerne certains types.

Depuis leur premier isolement par DALLDORF (1948, 1949) et ses collaborateurs sur souriceaux nouveau-nés, de nombreux auteurs ont tenté l'adaptation à diverses cellules de ces virus avec des fortunes variables.

Comme l'ont montré MELNICK et GOLDMAN en 1951, BEHBEHANI et ses collaborateurs en 1962 (qui étudient plus spécialement les facteurs déterminant la susceptibilité de la souris aux COXSACKIEVIRUS A), puis DALLDORF en 1954, les COXSACKIEVIRUS A se multiplient très bien in vivo chez le souriceau nouveau-né, mais ce système apparaît peu commode d'emploi surtout pour l'identification du sérotype.

De plus, comme l'a montré VOICULESCO en 1966, on peut voir s'installer sur souriceaux une résistance vis-à-vis d'un même type (lui-même a testé une cinquantaine de souches CA 6 et montré que certaines d'entre elles ne multipliaient pas sur souriceaux).

Enfin, les souriceaux doivent être inoculés avant 4 jours.

HEINEBERG et ses collaborateurs ont montré en 1964 que la résistance des souriceaux âgés aux COXSACKIEVIRUS B pouvait s'expliquer par la présence dans leurs cellules d'une quantité croissante d'interféron en fonction de leur âge.

Les premiers essais d'adaptation à un système cellulaire *in vitro* débutent dès 1950 avec les travaux de SLATER et SYVERTON, et avec ceux de GODENNE et CURNEN (1952) qui utilisent comme cellules celles provenant de la membrane chorioallantoïque de l'oeuf embryonné.

En 1961, WENNER et LENAHAHAN s'intéressent à l'adaptation des COXSACKIEVIRUS A à différentes cellules de mammifères.

En 1962, MUFSON et ses collaborateurs montrent que la multiplication du CA 21 sur cellules Hep 2 est favorisée par la mise en rotation des cellules pendant l'incubation, ce qui aurait pour but de favoriser l'oxygénation des cellules et d'exacerber l'action cytopathogène du virus.

BUDHAL en 1963 étudie le même type de COXSACKIE A sur culture de cellules de poumons de souris et montre qu'il obtient des plages de lyse, distinctes, à condition que la culture cellulaire soit mise en présence de 5 à 8 % de CO₂. Si cette concentration est inférieure à 2 %, ces plages diminuent et disparaissent en l'absence de CO₂.

FELICI et ses collaborateurs en 1965 tentent l'adaptation à la culture secondaire de cellules amniotiques humaines des COXSACKIEVIRUS A. Ce sont les seuls auteurs qui parviennent à adapter les types 1, 5, 6 et 19.

Par contre, ils ne réussissent pas à adapter les types 12, 14, 15 et 24.

VOICULESCO et ses collaborateurs en 1969, au cours d'un symposium à BUCAREST, montrent qu'ils ont adapté le type 10 sur cellules de rein de singe après 6 passages aveugles en ajoutant toutefois aux deux premiers passages de l'hydrocortisone à la concentration de 0,0025 mg/ml de milieu de PARKER, s'appuyant sur les données de WILLMER de 1961 sur l'action des stéroïdes sur les membranes cellulaires.

Pratiquement, selon LENAHAHAN en 1961 et BEHBEHANI en 1967, tous les types sauf les types : 1, 5, 6, 19 et 22 ont pu être adaptés à un système cellulaire. Selon ces derniers auteurs, les cellules sensibles utilisées donnant les meilleurs résultats sont les cellules amniotiques primaires humaines, les cellules de reins d'embryons humains et les cellules diploïdes d'embryons humains (cellules WI 38).

Cependant, l'utilisation de telles cellules, difficiles à cultiver et de faible rendement, nécessite un laboratoire bien équipé.

C'est pourquoi, nous avons essayé, au cours de notre travail, de trouver un système cellulaire permettant l'adaptation du plus grand nombre possible de COXSACKIEVIRUS A.

Notre choix s'est porté sur les cellules thyroïde primaire, leur subculture, les cellules Am 57 et les WI 38.

Si nous considérons les souches prototypes obtenues sur souriceaux nouveau-nés :

10 souches sur 23 ont pu être adaptées aux différentes cellules testées, soit 43,5 %.

Ce sont les mêmes types pour les 4 sortes de cellules : CA 7, CA 9, CA 11, CA 13, CA 14, CA 15, CA 18, CA 20, CA 21 et CA 24.

Considérons maintenant les souches prototypes obtenues par adaptation à la cellule amniotique primaire des broyats de souriceaux prototypes :

18 souches prototypes ont été testées.

10 souches sur 18 ont pu être adaptées après 3 passages aux cellules thyroïdiennes et à leur subculture et 10 souches (les mêmes d'ailleurs) à la cellule Am 57 :

soit 55,6 % des souches.

Sur cellules WI 38, nous constatons tout d'abord que nos résultats sont à peu près identiques à ceux observés par BEHBEHANI en 1967, à la différence qu'il avait pu adapter le COXSACKIEVIRUS type 2 et non le 10, alors que nous-mêmes avons réussi l'inverse. Hormis ceci, le nombre des souches adaptées à cette cellule est le même, soit 12 souches sur 18 : c'est à dire 66,7 %.

Voyons les résultats obtenus à partir de souches provenant de selles de malades, isolées sur souriceaux nouveau-nés :

29,3 % des souches testées ont pu être adaptées à la cellule Am 57,

31,7 % à la cellule thyroïde,

49 % à la cellule WI 38.

Il ressort de cette étude que la cellule WI 38 est celle qui nous a donné les meilleurs résultats ; nous l'avons introduite dans notre laboratoire pour la recherche systématique des COXSACKIEVIRUS A.

II - QUELS SONT LES MOYENS DONT ON DISPOSE POUR FAVORISER L'ATTACHEMENT DES VIRIONS SUR CELLULES IN VITRO ?

Afin de favoriser l'attachement des virions in vitro sur cellules, deux solutions peuvent se présenter :

- soit obtenir des virions capables de s'attacher spontanément sur les cellules, d'y pénétrer et de s'y multiplier :
Peut-être les virions produits dans l'intestin de l'homme présenteraient-ils des caractéristiques différentes de celles des virus produits chez le souriceau et qui ont assuré notre matériel de travail.
- soit agir sur les récepteurs cellulaires en les modifiant par différents procédés pour faire que l'une des classes virales qui ne s'adsorbe pas, puisse se fixer sur les cellules.

La première voie nous ayant paru présentement impossible, nous avons fondé notre travail sur la seconde.

En premier lieu, avant même de modifier la paroi des cellules, il nous est apparu que pour un même type cellulaire, l'âge auquel nous utilisions ces cellules était très important.

En effet, sur cellules thyroïde primaires, pour obtenir le maximum de chances d'avoir un effet cytopathique, il est nécessaire d'inoculer les cellules 48 heures au plus après leur mise en culture, sinon l'effet cytopathique est partiel, souvent difficile à voir.

Or, très rapidement, les cellules épithéliales deviennent fibroblastiques et il n'est pas interdit de penser que cette perte de la sensibilité des cellules en fonction de leur âge est due en fait à ce que les cellules épithéliales seraient plus aptes à assurer la multiplication des COXSACKIEVIRUS A, la permissivité des cellules amniotiques primaires humaines plaidant en cette faveur. D'ailleurs, dans les cultures jeunes, ce sont essentiellement les îlots épithéliaux qui sont détruits.

En ce qui concerne la modification des récepteurs cellulaires, nous avons tout d'abord tenté de modifier ceux-ci à l'aide de composés chimiques, nous reportant à des publications dans lesquelles ces produits avaient été utilisés avec la plupart du temps, du succès.

Ainsi, BANGHAM et son équipe en 1964 montrent l'action de la Vitamine A sur la membrane cellulaire.

Nous avons également utilisé cette vitamine sur des cellules que nous avons inoculées en suspension ce qui, selon ALLISON et VALENTINE (1960) favorise le contact virus/cellules et par conséquent, l'attachement viral.

Nous n'avons cependant pas obtenu des modifications dans l'adsorption du virus CA 1 sur cellules Am 57 grâce à la vitamine A.

Le deuxième composé chimique que nous avons étudié est un polyclation : le DEAE Dextran.

LIEBERHABER et ses collaborateurs montrent en 1961 l'action favorisante du DEAE Dextran sur la multiplication du virus de l'encéphalomyocardite.

En 1962, SMULL et LUDWIG mettent en évidence l'intérêt de l'emploi du DEAE Dextran sur l'attachement viral qui agirait selon l'auteur au niveau des particules virales et non au niveau des cellules, ce qui n'est pas l'avis de KAPLAN qui, en 1967, montre l'efficacité du DEAE Dextran sur l'attachement du virus de la rage, admettant qu'il agit au niveau de la membrane cellulaire et plus précisément sur la polarisation de celle-ci.

Au cours de nos expériences, nous avons utilisé le DEAE Dextran et nous l'avons fait agir à la fois au niveau de la cellule, en l'introduisant dans les milieux de culture cellulaire, et au niveau des virions, en pratiquant un contact entre la suspension virale et la solution de DEAE Dextran.

Cependant comme nous l'avons montré, nous n'avons pu mettre en évidence l'action favorisante de ce polycation sur l'adsorption des virions sur cellules Am 57.

Une autre possibilité de favoriser l'adsorption et la pénétration cellulaire est l'utilisation d'un autre virus servant d'aide dit "HELPER".

Dans ce cas, on se sert d'un virus pour lequel la cellule est permissive dans l'espoir qu'il entraînera avec lui, dans cette cellule, le virus pour lequel elle n'était pas permissive.

Ainsi, NEFF et ENDERS en 1968, réussirent à obtenir une multiplication du Polio virus type I dans les cellules d'embryons de hamster en lignée continue (alors que cette cellule n'est pas permissive à ce virus), en utilisant le virus SENDAI inactivé par les U.V. qui est capable de former sur les cellules de hamster des syncytia et par conséquent de provoquer une modification de la membrane cellulaire.

Nous avons, quant à nous, employé le virus Polio 1 qui est capable de se multiplier sur cellules Am 57 pour favoriser la pénétration du CA 1 qui lui, nous l'avons vu, ne s'y multiplie pas.

Aucune modification dans l'adsorption du CA 1 n'a pu être mise en évidence en utilisant le virus Polio type I comme HELPER.

Cependant, nous n'avons pas complètement abandonné la technique de NEFF et notre idée actuelle est de reprendre son travail en utilisant le virus SENDAI et un COXSACKIEVIRUS.

Les premiers essais pour reproduire son expérimentation avec virus SENDAI et Polio virus sont d'ailleurs bons et nous poursuivons maintenant avec les virus SENDAI et CA 13.

III - PROBLEME FONDAMENTAL POSE PAR LES COXSACKIEVIRUS A

De très nombreux travaux ont été publiés concernant cette impossibilité qu'ont les COXSACKIEVIRUS A à se multiplier in vitro sur des cellules murines alors que la multiplication de ces virus in vivo sur le souriceau nouveau-né comme l'ont montré MELNICK et GOLDMAN, est bonne.

En 1964, CAME et CROWELL étudient la résistance du tissu foetal de souris aux COXSACKIEVIRUS A.

Ces auteurs montrent l'inaptitude qu'ont les virus CA 13 et CA 18 à se multiplier in vitro sur tissu trypsiné ou simplement émincé de souris mis en milieu de croissance, alors qu'en cultivant un tissu émincé de souriceaux préalablement inoculés par le CA 13, ils montrent qu'il y a production de ce virus dans le milieu de culture.

Ils concluent, soit à la présence d'une population cellulaire résistante in vitro aux virus, soit à la destruction des récepteurs viraux lors de la trypsination des tissus ou bien lorsque ceux-ci sont émincés, soit encore à la libération dans le milieu d'inhibiteurs ou d'enzymes endogènes au cours du traitement des tissus.

Notons d'ailleurs qu'un travail de ZAJAC et CROWELL (1965) montre qu'une solution de trypsine ou de chymotrypsine à 1 % est capable d'inactiver les récepteurs cellulaires des cellules Hela, rendant impossible l'attachement de certains Entérovirus.

En 1964, GENCE montre que le CA 6 qui se multiplie bien *in vivo* sur souriceaux nouveau-nés, est incapable de se multiplier sur une culture primaire de cellules de souris et pose comme hypothèse la destruction des récepteurs cellulaires lors de la trypsination comme le pensent CAME et CROWELL, ou bien, une altération dans le mécanisme intracellulaire de la synthèse virale.

Egalement en 1964, KANTOCH et KUCZOKOWSKA mettent au point la culture de cellules de muscle de souris sur du collagène reconstitué, culture perfectionnée en 1965 (a et b) par KANTOCH et SIEMINSKA. Ils utilisent ces cellules afin d'étudier leur permissivité au CA 4. Ces auteurs n'obtiennent pas un effet cytopathique très net, cependant ils ont pu mettre en évidence quelques cellules dégénérées d'apparition très lente.

Ils pensent que peut-être les conditions d'infection des cultures de muscle de souris ne sont pas optimales ou bien qu'il y aurait interférence avec d'autres virus de la souris.

Un article intéressant de GEME et ses collaborateurs datant de 1967, montre que le RNA du CA 6 est incapable d'induire *in vitro* sur cellules foetales de souris et *in vivo* sur souriceaux nouveau-nés, une réplication virale.

Ces auteurs montrent également l'impossibilité de faire multiplier le virus entier sur tissu foetal de souris.

Ils en déduisent donc que la perte des récepteurs viraux sur les cellules foetales de souris due à la trypsination et à la mise en culture des tissus, ne doit pas expliquer la non permissivité des cellules de souris *in vitro* au CA 6.

Les auteurs penchent plutôt pour une altération du potentiel de la synthèse virale au niveau des cellules ou bien pour une altération de l'intégrité biologique du génome viral.

GOLDBERG et ses collaborateurs en 1969 montrent qu'ils ont pu obtenir une multiplication très faible du CA 13 sur des cultures de cellules foetales de souris et qu'ils ont pu faire répliquer du RNA extrait du CA 13 sur ces cellules, ce qui est en contradiction avec la précédente publication mais recoupe une publication datant de 1959 de MAC LAREN qui prouvait que le RNA extrait d'Entérovirus était capable de se répliquer dans de nombreuses cellules de mammifères.

Nous avons pu avancer une autre hypothèse sur le fait que l'on puisse difficilement adapter ces COXSACKIEVIRUS A à un système cellulaire humain ou murin *in vitro*.

En effet, nous pouvons penser que seulement une très faible partie de la population virale constituant la suspension globale peut s'adsorber sur les cellules sans toutefois y pénétrer ou bien pénétrer dans ces cellules sans avoir un cycle complet de replication ; c'est du moins ce qu'il semble ressortir de notre travail de chromatographie que nous discuterons plus loin.

Notre expérience de marquage à l'uridine tritiée d'une suspension de CA 13, destinée à confirmer cette hypothèse, semble bien nous le prouver.

Afin de mettre en évidence une faible adsorption du virus CA 1 sur cellules WI 38, nous avons mis à profit le phénomène de l'interférence que l'on utilise pour le diagnostic de rubéole.

Dans notre travail, nous avons choisi comme virus interférant, un virus du même type que le CA 1 : le CA 13, pour lequel les cellules WI 38 sont permissives.

Afin d'augmenter la sensibilité de la méthode, nous avons marqué le virus interférant à l'uridine tritiée et nous avons suivi en fonction du temps sa courbe d'adsorption sur des cellules WI 38 normales et sur des cellules sur lesquelles nous avons fait adsorber pendant une heure à 37°C une suspension de virus CA 1 (voir Chapitre "Résultats", page 32).

Or les résultats semblent nous montrer qu'il y a adsorption d'une partie des virions CA 1 puisque la fixation des virions CA 13 est notablement retardée sur les cellules traitées par rapport à celle observée sur cellules normales.

On peut admettre :

- soit que le CA 1 est élué après s'être fixé sur les récepteurs cellulaires, cédant la place au CA 13,
- soit que le CA 1 pénètre dans la cellule mais ne s'y multiplie pas.

Peut-il y avoir adsorption non spécifique des virions CA 1 sur les cellules ?

Il semble que l'on puisse admettre, d'une part, que la faible multiplicité virus/cellules utilisée ne peut provoquer un encombrement stérique empêchant l'attachement du CA 13 sur les cellules, d'autre part, que les virions CA 1 se fixent bien sur les récepteurs cellulaires puisqu'ils empêchent l'adsorption du CA 13 sur les cellules.

Une autre remarque peut être faite :

En effet, les récepteurs cellulaires ne sont certainement pas modifiés par le CA 1 puisque le virus CA 13 pénètre dans les mêmes proportions sur cellules traitées et sur cellules normales avec seulement un retard de 30 minutes.

IV - ETUDE DES CARACTERES DES VIRIONS CONSTITUANT LES SUSPENSIONS DE CA 1 ET DE CA 13.

Il est en effet intéressant de savoir quels sont les caractères de ces virions pour expliquer peut-être la difficulté que nous avons d'isoler les COXSACKIEVIRUS A sur cellules in vitro.

C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé la chromatographie sur phosphate de calcium et que nous nous sommes plus particulièrement attachés à l'étude des diagrammes d'élution des suspensions de CA 13 et CA 1, diagrammes que JEDDI (1971) considère comme de véritables "cartes d'identité" des virus, tant la reproductibilité de ces diagrammes pour une même suspension virale est bonne.

La première observation que nous avons pu faire réside en l'hétérogénéité des suspensions virales quelle que soit la suspension chromatographiée.

Ainsi, tous les virions ne sont pas élués dans une seule fraction, mais au cours de plusieurs fractions, chacune d'elles ayant des propriétés biologiques différentes, ce que JEDDI a bien montré pour le virus Echo 11.

Il prouve en effet pour l'Echo 11 que certaines classes de virions ont un pouvoir hémagglutinant et d'autres non, et que vis-à-vis d'un immunsérum préparé avec le virus global, les différentes fractions ne se comportent pas de façon identique.

En ce qui nous concerne, nous avons pu mettre en évidence pour la suspension de CA 13 préparée sur souriceaux nouveau-nés (hormis l'hétérogénéité dont nous avons déjà parlé et que l'on pouvait d'ailleurs soupçonner car on sait que par passages sur cellules les virus perdent leur pouvoir pathogène sur souriceaux), une différence de l'activité biologique des diverses fractions.

On a pu voir en effet que toutes les fractions n'avaient pas la même aptitude à s'adapter à un système cellulaire.

Ainsi, 63 % des virions qui sont élués dans la fraction VI à la molarité de 0,1 M ne sont pas capables de s'adapter à la cellule WI 38 alors que les virions élués dans les fractions VII et VIII aux molarités 0,2 M et 0,3 M s'adaptent à ce système cellulaire.

Si l'on considère la suspension de CA 1 préparée sur souriceaux, on remarque que dans le diagramme d'élution de cette suspension manquent les fractions VII et VIII.

Ces résultats nous ont amenés à penser que le COXSACKIEVIRUS A 1 ne se multiplie pas sur cellules WI 38 parce que manquent à sa population de virions, multipliés chez le souriceau, les virions contenus dans les fractions VII et VIII.

Or, nous avons vu antérieurement que ces deux classes de virions étaient celles qui sont adaptables à la cellule WI 38 en ce qui concerne le CA 13.

De même, nous avons pu montrer que la fraction VI qui est présente dans le diagramme d'élution de la suspension virale CA 13 préparée sur souriceaux nouveau-nés n'est pas adaptable à la cellule WI 38 puisqu'après 3 passages, la diminution du titre infectieux de cette fraction est de l'ordre de 99 %.

Dans le diagramme d'élution du CA 1, on retrouve bien cette fraction VI mais il n'est donc pas étonnant qu'elle ne soit pas adaptable au système cellulaire WI 38.

Nous devons pour confirmer tout ceci reprendre ces expériences avec d'autres types de COXSACKIEVIRUS A.

V - HYPOTHESES POUR UNE EXPERIMENTATION FUTURE

A la suite des travaux de KUSANO (1970) et de ceux de WANG (1970), nous pensons utiliser des lignées cellulaires hybrides (cellules humaines/cellules murines) afin de tester leur permissivité aux COXSACKIEVIRUS A, comme ces auteurs l'ont fait pour le Polio virus. On peut encore envisager de cultiver ensemble deux systèmes cellulaires, l'un apportant ainsi des éléments cellulaires peut-être indispensables à la multiplication des COXSACKIEVIRUS A et manquant dans les cellules non permissives.

D'autre part, nous voudrions également voir le rôle que peuvent jouer les différents oligo-éléments sur la multiplication virale.

La culture en anaérobiose est également une technique que nous voudrions exploiter à la suite des travaux de VOICULESCO et KANTOCH.

Comme nous l'avons déjà dit, il nous semble qu'il serait intéressant de poursuivre l'étude chromatographique des suspensions d'autres types de COXSACKIEVIRUS A.

De très nombreuses inconnues persistent donc sur cette non permissivité des cellules murines ou humaines aux COXSACKIEVIRUS A.

Si l'on obtenait la multiplication des COXSACKIEVIRUS A sur les cellules cultivées in vitro, nos connaissances sur le pouvoir pathogène et l'épidémiologie des infections qu'ils provoquent chez l'homme seraient notablement améliorées.

RESUME

Notre but au cours de ce travail a été l'étude de l'adaptation des COXSACKIEVIRUS A à des différentes cellules en culture.

Nous avons envisagé tout d'abord le problème du point de vue pratique, c'est-à-dire l'étude de la permissivité de quatre sortes de cellules à ces virus :

- les cellules thyroïdiennes en culture primaire,
- la première subculture de la cellule précédente,
- la lignée continue Am 57,
- les cellules diploïdes WI 38.

Il nous est apparu que la cellule permettant l'adaptation du plus grand nombre de types était la cellule WI 38, que ce soient les souches prototypes ou les souches provenant de selles de malades, isolées sur souriceaux nouveau-nés.

Par la suite, nous avons utilisé des artifices divers tels que :

- la vitamine A,
 - le D.E.A.E. Dextran,
 - l'utilisation d'un virus "helper",
- afin de favoriser l'attachement du COXSACKIEVIRUS A type 1 sur cellules Am 57, non permissives à ce type viral.

Cependant, aucun de ces artifices n'a permis de mettre en évidence une adsorption de ce COXSACKIE sur ces cellules.

Une étude cinétique de l'adsorption sur cellules WI 38 d'une suspension de COXSACKIEVIRUS A type 13, marquée à l'uridine tritiée, a permis de montrer que ce virus s'adsorbait de façon différente selon que les cellules WI 38 étaient normales ou préalablement mises en contact avec une suspension de COXSACKIEVIRUS A type 1, ce qui nous a amenés à penser que peut-être une partie des virions constituant la suspension de COXSACKIEVIRUS A type 1, était capable de se fixer sur les récepteurs des cellules WI 38, retardant l'adsorption du COXSACKIEVIRUS A type 13.

Un travail de chromatographie a été envisagé afin de mettre en évidence les raisons pour lesquelles certains types de COXSACKIEVIRUS A multipliaient sur cellules et d'autres non.

Grâce à l'étude comparée des différents diagrammes d'élution des suspensions de COXSACKIE A type 13 et COXSACKIE A type 1, nous avons montré qu'il manquait à la population virale du COXSACKIE A type 1 provenant de broyats de souriceaux (non adaptables jusqu'ici à la cellule en culture) les classes de virions nécessaires à la multiplication du COXSACKIE A type 13 sur cellules.

Ainsi nous avons pu constater que le COXSACKIE A type 13 multipliait sur cellules WI 38 grâce à ses classes virales VII et VIII, classes qui font défaut à la population du COXSACKIE virus A type 1.

CONCLUSIONS

Notre but était d'étudier l'adaptation des COXSACKIEVIRUS A à la multiplication dans les cellules en culture.

On sait qu'un certain nombre de COXSACKIEVIRUS A peuvent se multiplier directement sur culture de cellules humaines et qu'un certain nombre d'autres ont pu être adaptés à la multiplication sur cellules humaines (culture primaire de cellules amniotiques ou souches diploïdes WI 38).

Nous avons pu adapter sur culture primaire de cellules thyroïdiennes et sur la lignée continue Am 57, 10 COXSACKIEVIRUS A, ce sont les types : 7, 9, 11, 13, 14, 15, 18, 20, 21, 24 et les types 10 et 16 seulement sur cellules WI 38.

Dans le but de préciser les raisons pour lesquelles certains COXSACKIEVIRUS A (tel le type 1) n'ont pu à ce jour être adaptés aux cultures de cellules, alors que les types précités pouvaient l'être, nous avons procédé à une étude comparée du comportement du COXSACKIEVIRUS A type 1, non adaptable jusqu'ici, et du COXSACKIEVIRUS A type 13 dont l'adaptation a été réalisée.

Les tentatives faites pour obtenir la fixation et la pénétration du COXSACKIEVIRUS A type 1 dans la lignée continue Am 57 à l'aide de Vitamine A, à l'aide de DEAE Dextran, ou en utilisant le POLIOVIRUS type 1 ont échoué.

Toutefois, lorsque le virus COXSACKIE A type 1 est mis en présence de cellules WI 38, il retarde de façon significative l'adsorption du COXSACKIEVIRUS A type 13, lequel est apte à se multiplier dans ces cellules. Ce phénomène a été confirmé au cours d'une étude comportant le marquage du COXSACKIEVIRUS A type 13 à l'uridine tritiée.

Une étude chromatographique comparée des virus COXSACKIE A type 1 et 13, multipliés sur souris, a montré qu'une partie de la population virale du COXSACKIEVIRUS A type 13 était capable de se multiplier sur culture cellulaire et que cette population n'était pas retrouvée dans celle du COXSACKIEVIRUS A type 1.

On peut se demander si l'absence de cette population de COXSACKIEVIRUS A type 1 dans la zone où l'on retrouve une population infectieuse

de COXSACKIEVIRUS A type 13 peut expliquer l'inaptitude du virus COXSACKIE A type 1 à se multiplier sur les cultures cellulaires.

Il conviendrait de rechercher si la population virale infectieuse pour les cellules en culture et trouvée dans une suspension de COXSACKIEVIRUS A type 13, a une structure physique ou biochimique différente des autres populations obtenues par chromatographie, c'est ce que nous nous proposons de faire.

Le Président de la Thèse :

R. SOHIER

Vu, pour le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques,

Le Directeur Adjoint

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 12 septembre 1972

Le Président de l'Université
Claude-Bernard

L. ODDOUX

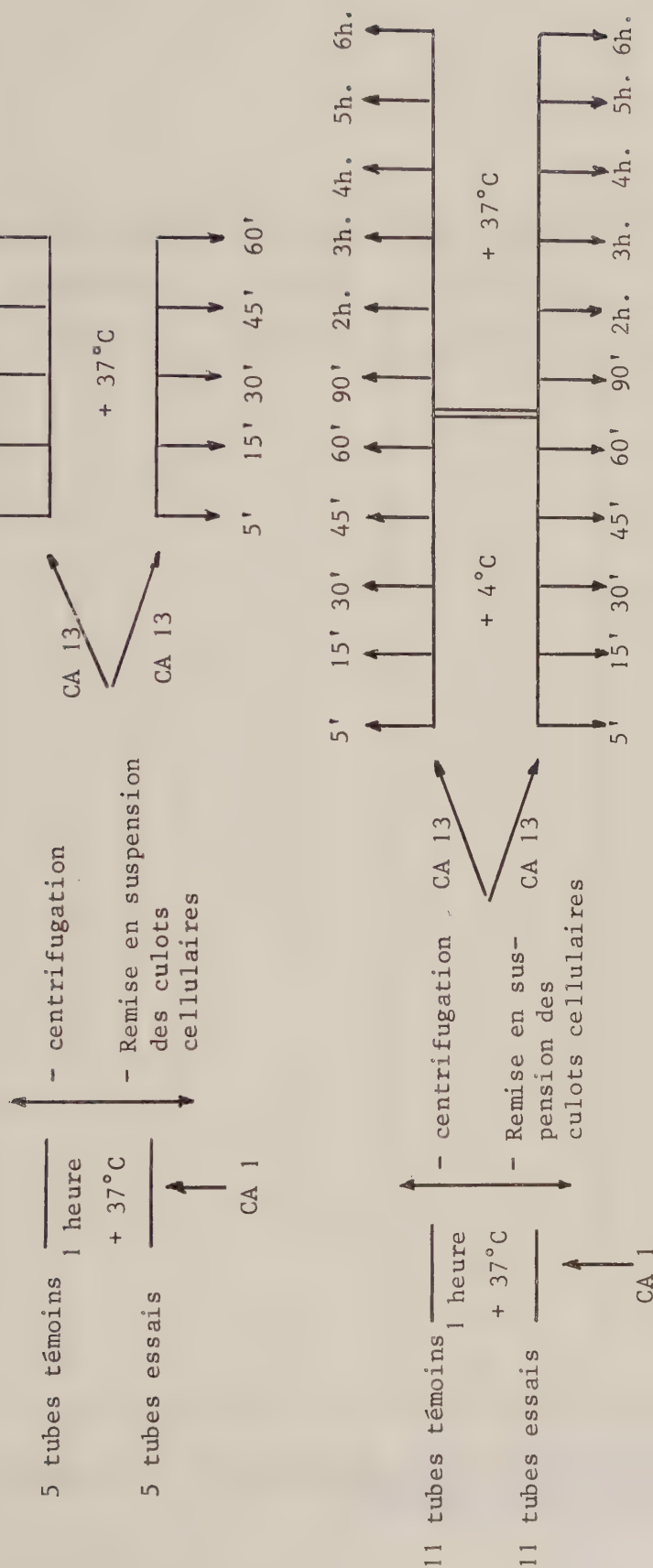
J. BOIDIN

STABILISATION DES FRACTIONS DE CHROMATOGRAPHIE

N° des Fractions	Molarité correspon- dante	Volume Eluat *	Volume H ₂ O Δ	Volume Alb. bovine à 70 g°/°	Dilution Finale des Fractions
I	0,01 M	1	0	1	1/2
II	0,02 M	1	0	1	1/2
III	0,03 M	1	0	1	1/2
IV	0,04 M	1	0	1	1/2
V	0,05 M	1	0	1	1/2
VI	0,1 M	1	0	1	1/2
VII	0,2 M	1	1	2	1/4
VIII	0,3 M	0,5	1	1,5	1/6
IX	0,4 M	0,5	1,5	2	1/8
X	0,5 M	0,5	2	2,5	1/10

* Les volumes sont exprimés en ml.

TABLEAU n° 1



SCHEMA n° 2 : SCHEMA DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE POUR L'ETUDE DE L'ADSORPTION
DU CA 13 MARQUE A L'URIDINE TRITIEE

SOURICEAUX PROTOTYPES TYPE :	CELLULES THYROIDE PRIMAIRES	SUBCULTURE DE CELLULES THYROIDE	WI 38	Am 57
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	+	+	+	+
8	0	0	0	0
9	+	+	+	+
10	0	0	0	0
11	+	+	+	+
12	0	0	0	0
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	+	+	+	+
19	0	0	0	0
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
22	0	0	0	0
24	+	+	+	+

TABEAU n° 3 : RESULTATS DE L'ESSAI D'ADAPTATION DES SOUCHES PROTOTYPES
OBTENUES SUR SOURICEAUX NOUVEAU-NES

SOUCHES PROTOTYPES TYPE	CULTURES THYROIDE PRIMAIRES	SUBCULTURE DE CELLULES THYROIDE	WI 38	Am 57
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
7	+	+	+	+
8	0	0	0	0
9	+	+	+	+
10	0	0	+	0
11	+	+	+	+
12	0	0	0	0
13	+	+	+	+
14	+	+	+	+
15	+	+	+	+
16	0	0	+	0
17	0	0	0	0
18	+	+	+	+
20	+	+	+	+
21	+	+	+	+
24	+	+	+	+

TABLEAU n° 4 : RESULTATS DE L'ESSAI D'ADAPTATION DES SOUCHES PROTOTYPES
OBTENUES SUR CELLULES AMNIOTIQUES PRIMAIRES

N° DES SOUCHES UTILISEES	CELLULES THYROIDE PRIMAIRES	SUBCULTURE DE CELLULES THYROIDE	WI 38	Am 57
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	+	+	+	+
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-
37	+	+	+	+
38	+	+	+	+
40	+	+	+	+
41	+	+	+	+
44	-	-	+	+
46	+	+	+	+
48	+	+	+	-
50	+	+	+	+

TABEAU n° 5 : RESULTATS DES ESSAIS D'ADAPTATION DES SOUCHES PROVENANT
DE SELLES DE MALADES, ISOLEES SUR SOURICEAUX NOUVEAU-NES.

N° DES SOUCHES UTILISEES	CELLULES THYROIDE PRIMAIRES	SUBCULTURE DE CELLULES THYROIDE	WI 38	Am 57
148	-	-	+	-
208	-	-	-	-
209	-	-	-	-
210	-	-	-	-
211	-	-	-	-
212	+	+	+	+
274	-	-	+	-
275	+	+	+	+
276	-	-	+	-
277	-	-	+	-
356	-	-	+	-
357	+	+	+	-
401	-	-	+	+
402	-	-	-	-
403	-	-	-	-
404	-	-	-	-
405	-	-	-	-
406	+	+	+	-
407	-	-	-	-
477	+	+	+	+

TABEAU n° 5 bis : RESULTATS DES ESSAIS D'ADAPTATION DES SOUCHES PROVENANT
DE SELLES DE MALADES, ISOLEES SUR SOURICEAUX NOUVEAU-NES

N° DES SOUCHES A IDENTIFIER	TITRE DES CELLULES WI 38*	TYPE DETERMINE
29	$10^{-5,16}$	CA 13
37	$10^{-5,38}$	CA 13
38	$10^{-5,38}$	CA 13
40	$10^{-5,5}$	CA 13
41	$10^{-5,16}$	CA 13
44	$10^{-4,63}$	CA 13
46	10^{-6}	CA 13 **
48	10^{-5}	CA 13
50	$10^{-5,16}$	CA 13
148	$10^{-5,76}$	N.Id ^{xx}
212	$10^{-6,84}$	N.Id
274	$10^{-4,16}$	CA 10
275	$10^{-5,38}$	CA 13
276	$10^{-3,38}$	CA 10
277	$10^{-5,16}$	CA 10
356	$10^{-4,38}$	CA 10
357	$10^{-5,5}$	CA 15
401	$10^{-5,38}$	CA 13
406	10^{-6}	N.Id
477	$10^{-5,5}$	CA 13

*titre exprimé en : doses infectieuses dans 0,1 ml
sur culture de cellules.

**N. Id : souche non identifiée à ce jour.

TABLEAU n° 6 : RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES SOUCHES
ADAPTEES A LA CELLULE WI 38

TITRAGE SUR WI 38 DES ELUATS DE
LA SUSPENSION DE CA 13 PREPAREE
SUR CELLULES WI 38.

FRACTION	MOLARITE	TITRE EN DOSES INFECTIEUSES DANS 0,1 ml.	% * D'ELUTION
I	0,01 M	10	0 %
II	0,02 M	10^3	0 %
III	0,03 M	$3,16 \times 10^3$	0,25 %
IV	0,04 M	$1,5 \times 10^4$	1,2 %
V	0,05 M	10^5	8,1 %
VI	0,1 M	$3,16 \times 10^2$	0,25 %
VII	0,2 M	$6,76 \times 10^5$	55 %
VIII	0,3 M	$4,26 \times 10^5$	35 %
IX	0,4 M	$3,16 \times 10^3$	0,25 %
X	0,5 M	$3,16 \times 10^3$	0,25 %

TABLEAU n° 7

TITRAGE SUR SOURICEAUX DES ELUATS
DE LA SUSPENSION DE CA 13 PREPA-
REE SUR CELLULES WI 38.

FRACTION	MOLARITE	TITRE EN DOSES INFECTIEUSES DANS 0,1 ml.	% * D'ELUTION
I	0,01 M	0	0 %
II	0,02 M	$3,2 \times 10^2$	0 %
III	0,03 M	10^3	0,28 %
IV	0,04 M	10^4	2,8 %
V	0,05 M	$5,3 \times 10^4$	14,4 %
VI	0,1 M	$5,3 \times 10^3$	1,4 %
VII	0,2 M	2×10^5	55 %
VIII	0,3 M	10^5	27,8 %
IX	0,4 M	$3,2 \times 10^2$	0 %
X	0,5 M	$3,2 \times 10^2$	0 %

TABLEAU n° 8

* Les pourcentages d'élution sont calculés par rapport au virus total fixé.

TITRAGE SUR SOURICEAUX DES ELUATS
DE LA SUSPENSION DE CA 13 PREPAREE
A PARTIR DE SOURICEAUX.

FRACTION	MOLARITE	TITRE EN DOSES INFECTIEUSES DANS 0,1 ml.	% D'ELUTION	*
I	0,01 M	$1,5 \times 10^2$	0	%
II	0,02 M	$2,4 \times 10^3$	0	%
III	0,03 M	$2,6 \times 10^2$	0	%
IV	0,04 M	$1,3 \times 10^2$	0	%
V	0,05 M	$4,5 \times 10^2$	0	%
VI	0,1 M	$2,4 \times 10^6$	72	%
VII	0,2 M	10^5	3,2	%
VIII	0,3 M	$5,1 \times 10^5$	15	%
IX	0,4 M	$3,6 \times 10^5$	9,7	%
X	0,5 M	$5,1 \times 10^3$	0	%

TABEAU n° 9

TITRAGE SUR WI 38 DES ELUATS DE LA
SUSPENSION DE CA 13 PREPAREE A PAR-
TIR DE SOURICEAUX.

FRACTION	MOLARITE	TITRE EN DOSES INFECTIEUSES DANS 0,1 ml.	% D'ELUTION	*
I	0,01 M	< 10	0	%
II	0,02 M	< 10	0	%
III	0,03 M	< 10	0	%
IV	0,04 M	< 10	0	%
V	0,05 M	$3,16 \times 10$	0,30	%
VI	0,1 M	$6,76 \times 10^3$	63	%
VII	0,2 M	$3,16 \times 10^3$	30	%
VIII	0,3 M	$4,26 \times 10^2$	4	%
IX	0,4 M	$3,16 \times 10^2$	3	%
X	0,5 M	< 10	0	%

TABEAU n° 10

* Les pourcentages d'élution sont calculés par rapport au virus total fixé.

TITRAGE SUR SOURICEAUX DES ELUATS DE LA SUS-
PENSION DE CA 1 PREPAREE A PARTIR DE SOURICEAUX.

FRACTION	MOLARITE	TITRE EN DOSES INFECTIEUSES DANS 0,1 ml.	* % D'ELUTION
I	0,01 M	0	0 %
II	0,02 M	$5,2 \times 10$	0 %
III	0,03 M	10^2	0 %
IV	0,04 M	$1,89 \times 10^2$	0 %
V	0,05 M	10^6	10 %
VI	0,1 M	$1,5 \times 10^6$	15 %
VII	0,2 M	$5,2 \times 10$	0 %
VIII	0,3 M	10^2	0 %
IX	0,4 M	$7,5 \times 10^6$	75 %
X	0,5 M	$3,2 \times 10^3$	0 %

TABLEAU n° 11

* Les pourcentages d'élution sont calculés par rapport au virus total fixé.

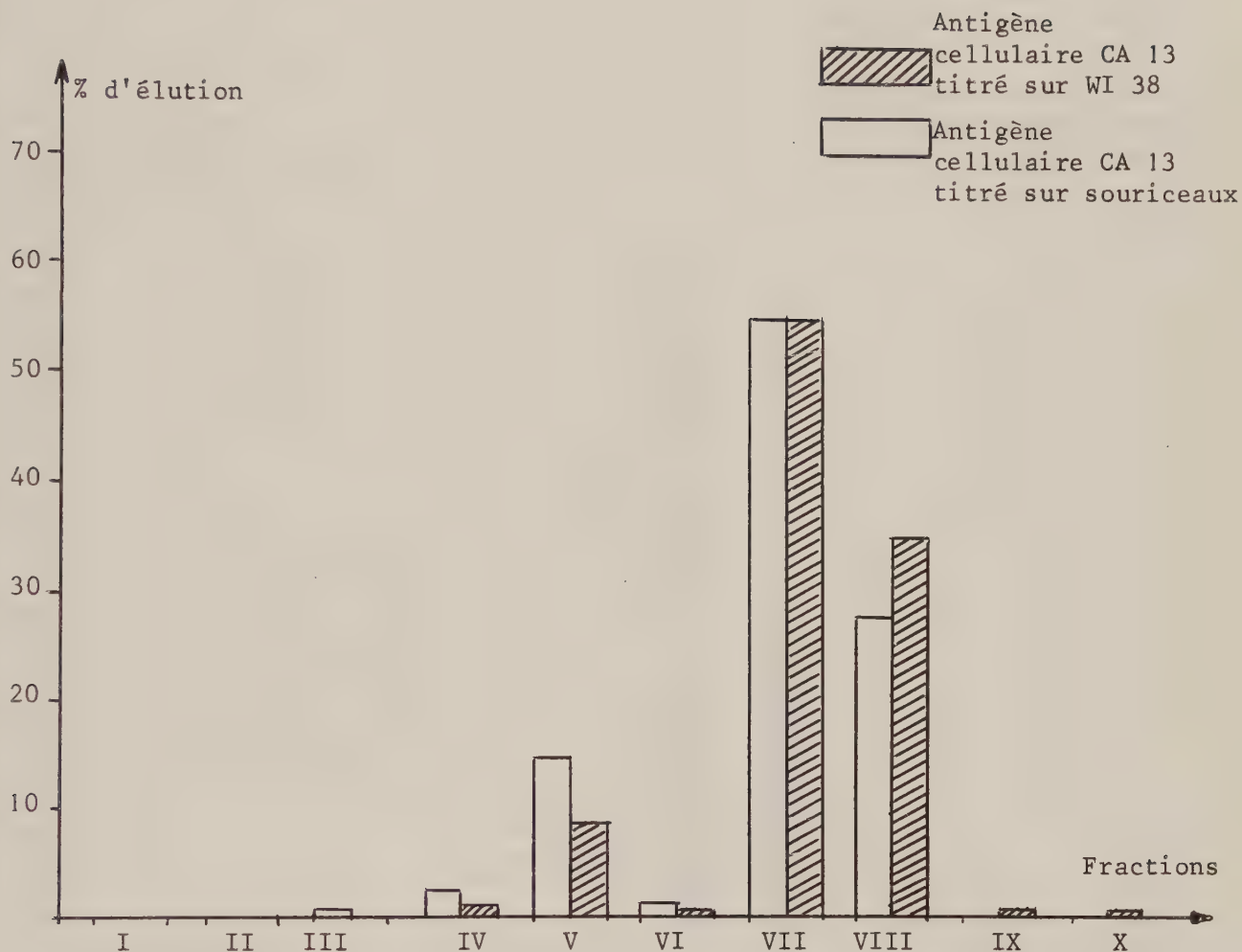


FIGURE n° 12 : DIAGRAMMES D'ELUTION DE LA SUSPENSION DE CA 13 PREPAREE SUR CELLULES WI 38

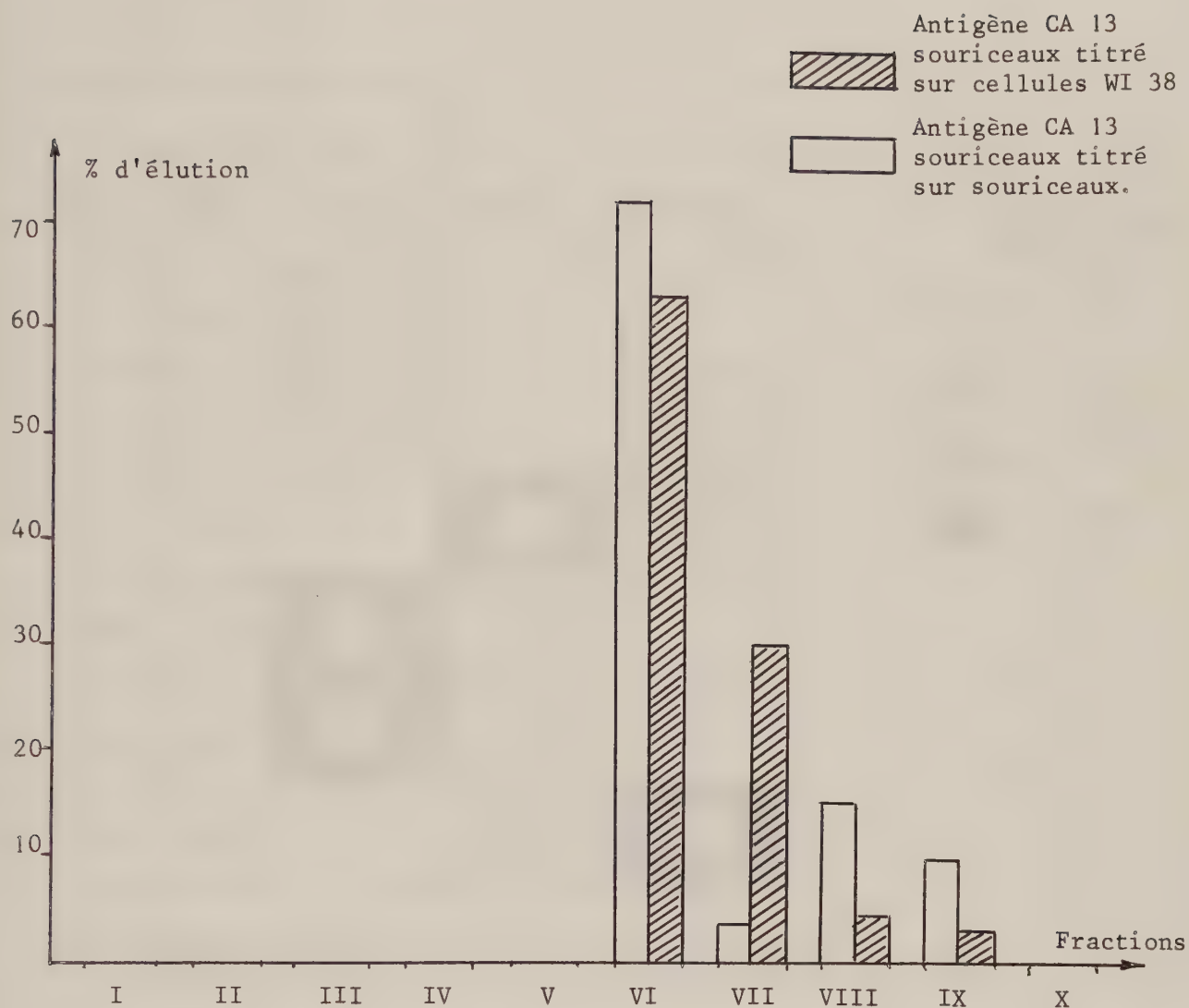
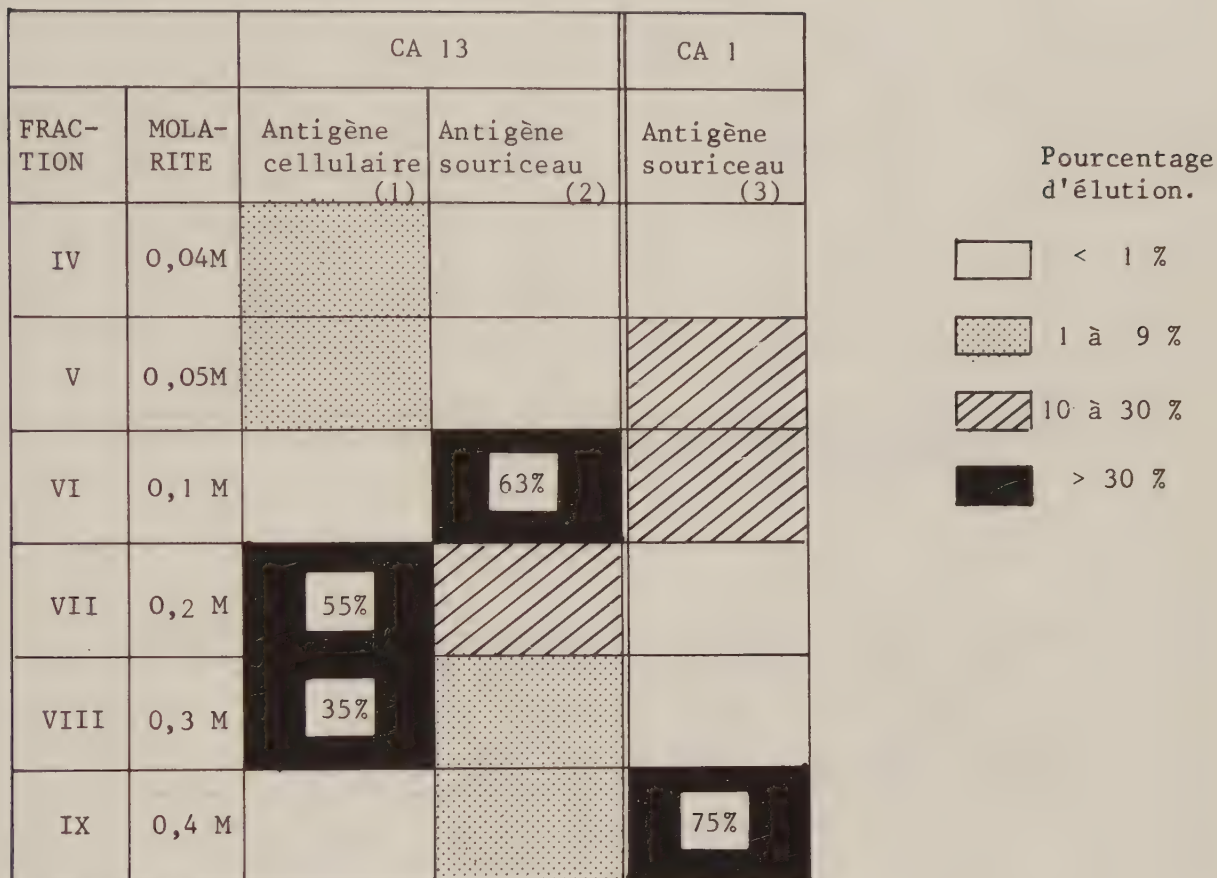


FIGURE n° 13 : DIAGRAMMES D'ELUTION DE LA SUSPENSION DE CA 13 PREPARE SUR SOURICEAUX



- (1) : Suspension de CA 13 préparée sur cellules WI 38.
Titration des éluats de chromatographie sur cellules WI 38.
- (2) : Suspension de CA 13 préparée à partir de souriceaux.
Titration des éluats de chromatographie sur cellules WI 38.
- (3) : Suspension de CA 1 préparée à partir de souriceaux.
Titration des éluats de chromatographie sur souriceaux.

FIGURE n° 14 : COMPARAISON DES DIAGRAMMES D'ELUTION DES DIFFERENTES
SUSPENSIONS VIRALES

	+ 37°	+ 4°
t ₀	$2,1 \times 10^5$	2×10^5
t + 5'	$1,9 \times 10^5$	$2,09 \times 10^5$
t + 15'	$2,09 \times 10^5$	$2,09 \times 10^5$
t + 30'	$2,1 \times 10^5$	$2,09 \times 10^5$
t + 60'	$2,09 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5$

TABLEAU n° 15 : ADSORPTION SUR CELLULES Am 57 D'UNE SUSPENSION DE CA 1 PREPAREE SUR SOURICEAUX.

	VITAMINE A 3 HEURES AVANT LE VIRUS	VITAMINE A EN MEME TEMPS QUE LE VIRUS	INOCULATION DU CONTACT VITAMINE A/VIRUS
t ₀	$1,63 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$	$1,52 \times 10^5$
t + 5'	$1,54 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$
t + 15'	$1,63 \times 10^5$	$1,54 \times 10^5$	$1,54 \times 10^5$
t + 30'	$1,63 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$
t + 60'	$1,63 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$	$1,63 \times 10^5$

TABLEAU n° 16 : ADSORPTION SUR CELLULES Am 57 D'UNE SUSPENSION DE CA 1 PREPAREE SUR SOURICEAUX, EN PRESENCE DE VITAMINE A.

* Titre exprimé en doses infectieuses dans 0,1 ml.

	DEAE DEXTRAN 3 HEURES AVANT LE VIRUS	DEAE DEXTRAN EN MEME TEMPS QUE LE VIRUS	INOCULATION DU CONTACT DEAE DEXTRAN/VIRUS
t ₀	$1,99 \times 10^5$ *	$1,99 \times 10^5$	$1,99 \times 10^5$
t + 5'	$1,82 \times 10^5$	$2,09 \times 10^5$	$1,99 \times 10^5$
t + 15'	$2,09 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$
t + 30'	$2,09 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$	$2,09 \times 10^5$
t + 60'	$1,82 \times 10^5$	$1,99 \times 10^5$	$1,82 \times 10^5$

TABLEAU n° 17 : ADSORPTION SUR CELLULES Am 57 EN PRESENCE DE DEAE DEXTRAN D'UNE SUSPENSION DE CA 1 PREPAREE SUR SOURICEAUX.

	TITRE DES SURNAGEANTS
t ₀	$1,63 \times 10^5$
t + 5'	$1,54 \times 10^5$
t + 15'	$1,54 \times 10^5$
t + 30'	$1,63 \times 10^5$
t + 60'	$1,54 \times 10^5$

TABLEAU n° 18 : ADSORPTION SUR CELLULES Am 57 EN PRESENCE D'UN HELPER D'UNE SUSPENSION DE CA 1 PREPAREE SUR SOURICEAUX.

* Les titres sont exprimés en doses infectieuses dans 0,1 ml.

	CELLULES Am 57 CULTIVEES EN MILIEU AU SERUM NORMAL	CELLULES Am 57 CULTIVEES EN MILIEU AU SERUM TRAITE/KAFOLIN
VIRUS CA 13 NON TRAITE PAR BENTONITE	$10^{-5,16}/0,1 \text{ ml}$ SUR Am 57	$10^{-5,32}/0,1 \text{ ml}$ SUR Am 57
VIRUS CA 13 TRAITE PAR BENTONITE	$10^{-5}/0,1 \text{ ml}$ SUR Am 57	$10^{-5,16}/0,1 \text{ ml}$ SUR Am 57

TABLEAU n° 19 : RESULTATS DU TITRAGE SUR CELLULES Am 57 DES
DIFFERENTES SUSPENSIONS VIRALES CA 13
TRAITEES OU NON.

	RADIO-ACTIVITE EN C.P.M.
MILIEU DE MARQUAGE	$3,6 \times 10^8$ cpm
RADIO-ACTIVITE RESIDUELLE	$1,47 \times 10^8$ cpm
1er LAVAGE	$0,23 \times 10^8$ cpm
2ème LAVAGE	$0,042 \times 10^8$ cpm
RADIO-ACTIVITE THEORIQUEMENT INCORPOREE	$\left[3,6 - (1,47 + 0,23 + 0,042) \right]$ $= 1,86 \times 10^8 \text{ cpm}$
RADIO-ACTIVITE REELLEMENT INCORPOREE	$1,77 \times 10^8$ cpm
% DE PERTE	4,8 %

TABEAU n° 20 : RESULTATS DU MARQUAGE A L'URIDINE TRITIEE
D'UNE SUSPENSION DE VIRUS CA 13.

θ°		% D'ADSORPTION	
		TEMOIN	ESSAI
+37°	0	0	0
	5'	42,7	15,9
	15'	61,1	18,8
	30'	56,7	22
	45'	55,4	23,9
	60'	54,8	52,5

TABLEAU n° 23 : RESULTATS EXPRIMES EN POURCENTAGE DE L'ADSORPTION DU CA 13 SUR CELLULES NORMALES ET TRAITEES, A 37°.

θ°		% D'ADSORPTION	
		TEMOIN	ESSAI
+ 4°	0	0	0
	5'	26,8	12,7
	15'	43,9	13,4
	30'	43,3	14,6
	45'	43,3	14
	60'	43,3	34,4
+ 37°	1h.30	55,4	55,4
	2h.	57,3	55,4
	3h.	56	54,8
	4h.	57,3	56
	5h.	56	57,3
	6h.	54,5	56

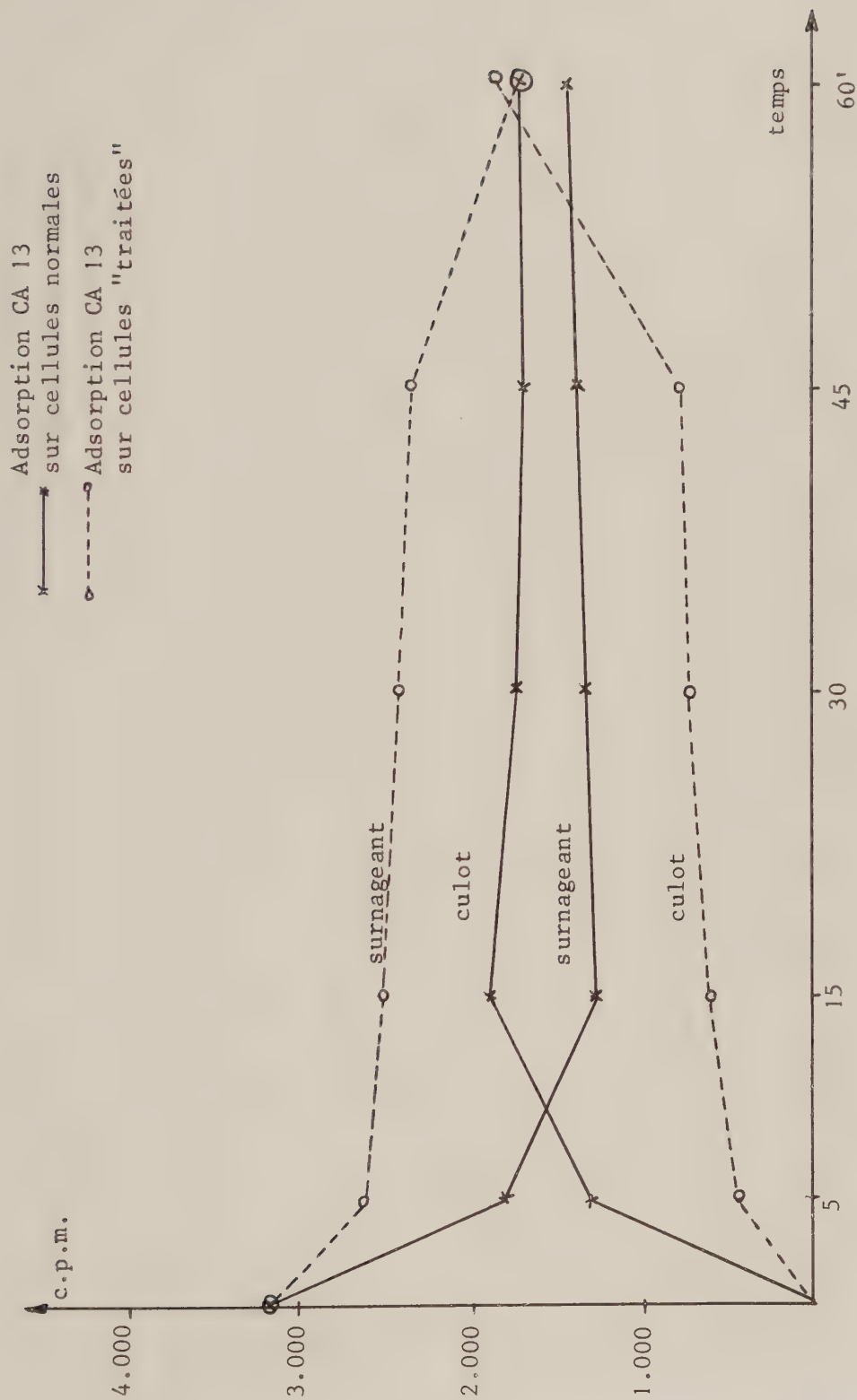
TABLEAU n° 24 : RESULTATS EXPRIMES EN POURCENTAGE DE L'ADSORPTION DU CA 13 SUR CELLULES NORMALES ET TRAITEES, A + 4° ET + 37°.

θ°		TEMOIN		ESSAI	
		SURNAGEANT en cpm	CULOT en cpm	SURNAGEANT en cpm	CULOT en cpm
37°	0	3.140	0	3.140	0
	5'	1.800	1.300	2.640	450
	15'	1.220	1.900	2.550	600
	30'	1.360	1.750	2.450	740
	45'	1.400	1.700	2.390	790
	60'	1.420	1.720	1.490	1.620

TABLEAU n° 21 : RESULTATS DE L'ADSORPTION A 37° DU CA 13 MARQUE A L'URIDINE TRITIEE, SUR CELLULES WI 38 NORMALES (TEMOIN) ET CELLULES "TRAITEES" (ESSAI)

θ°		TEMOIN		ESSAI	
		SURNAGEANT en cpm	CULOT en cpm	SURNAGEANT en cpm	CULOT en cpm
+ 4°	0	3.140	0	3.140	0
	5'	2.300	800	2.740	300
	15'	1.760	1.400	2.720	500
	30'	1.780	1.380	2.680	560
	45'	1.780	1.440	2.700	600
	60'	1.780	1.360	2.060	1.020
+37°	1h.30	1.400	1.740	1.400	1.700
	2h.	1.340	1.820	1.400	1.780
	3h.	1.380	1.900	1.420	1.820
	4h.	1.340	1.800	1.380	1.860
	5h.	1.380	1.700	1.340	1.860
	6h.	1.430	1.860	1.380	1.780

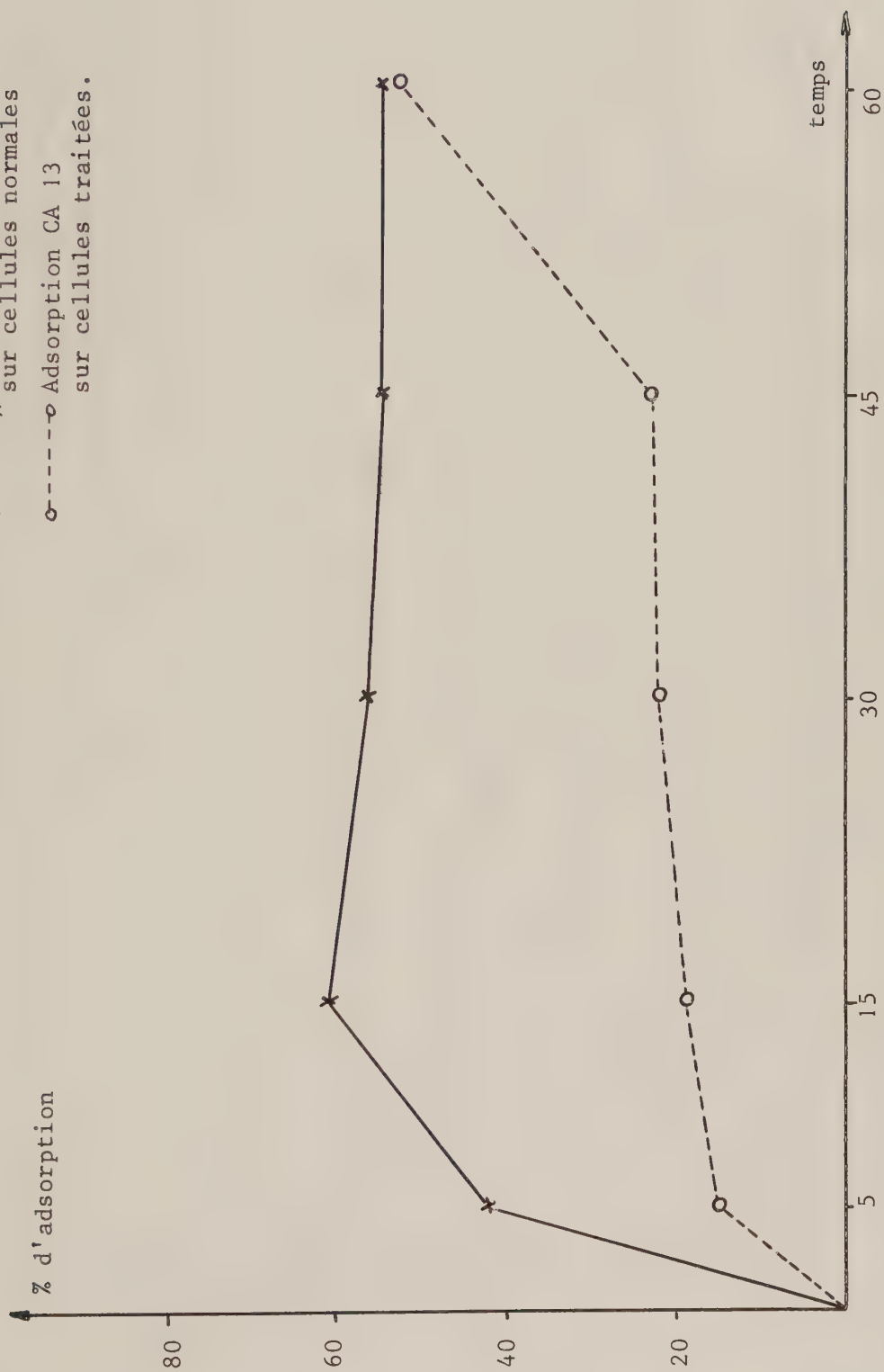
TABLEAU n° 22 : RESULTATS DE L'ADSORPTION A + 4° ET + 37° DU CA 13 MARQUE A L'URIDINE TRITIEE SUR CELLULES WI 38 NORMALES (TEMOIN) ET CELLULES "TRAITEES" (ESSAI)



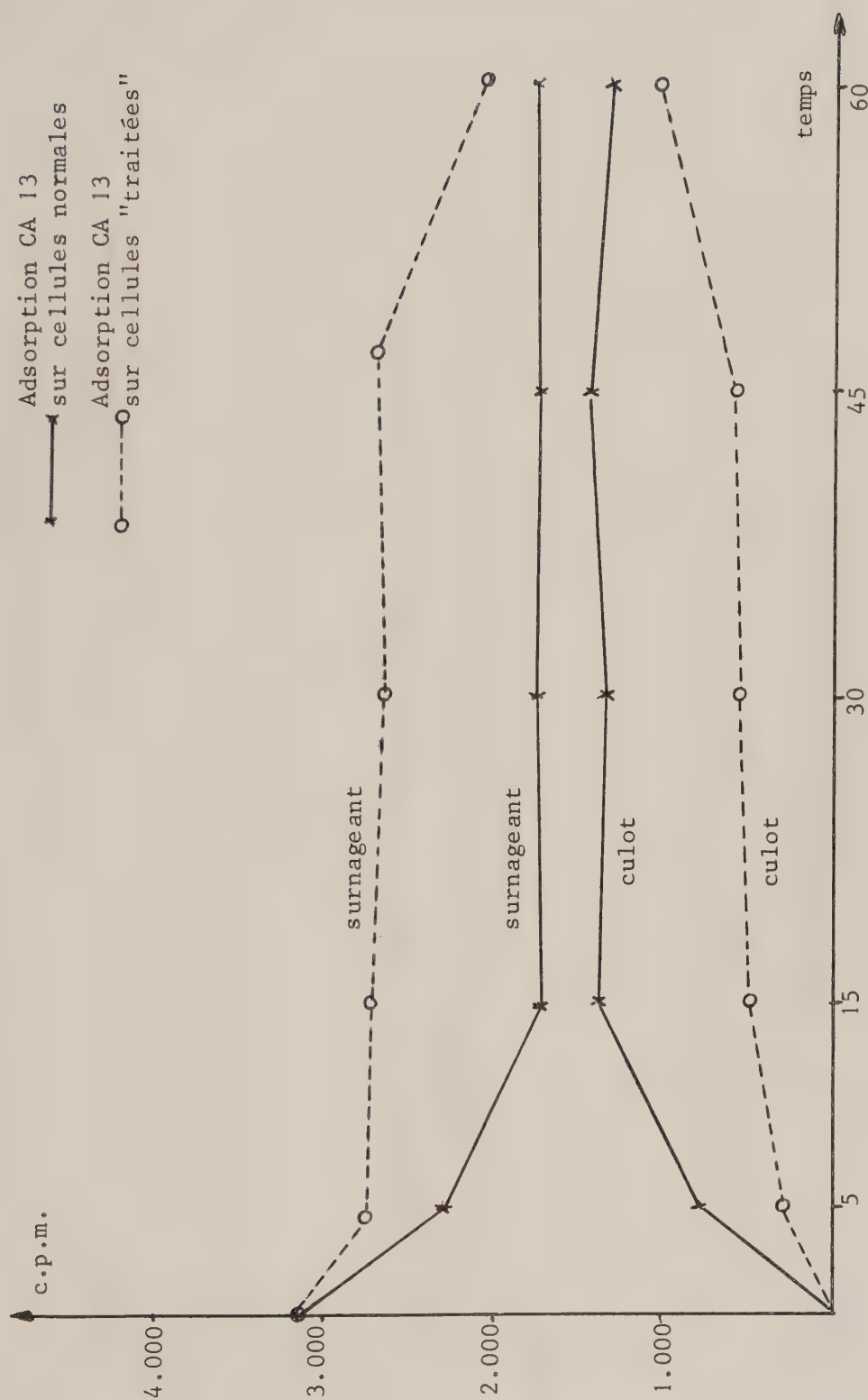
GRAPHE n° I : ETUDE DE L'ADSORPTION A 37° DU VIRUS CA 13 MARQUE A L'URIDINE TRITIEE

- sur cellules WI 38 normales,
 - sur cellules WI 38 "traitées".

Adsorption CA 13
sur cellules normales
○-----○ Adsorption CA 13
sur cellules traitées.

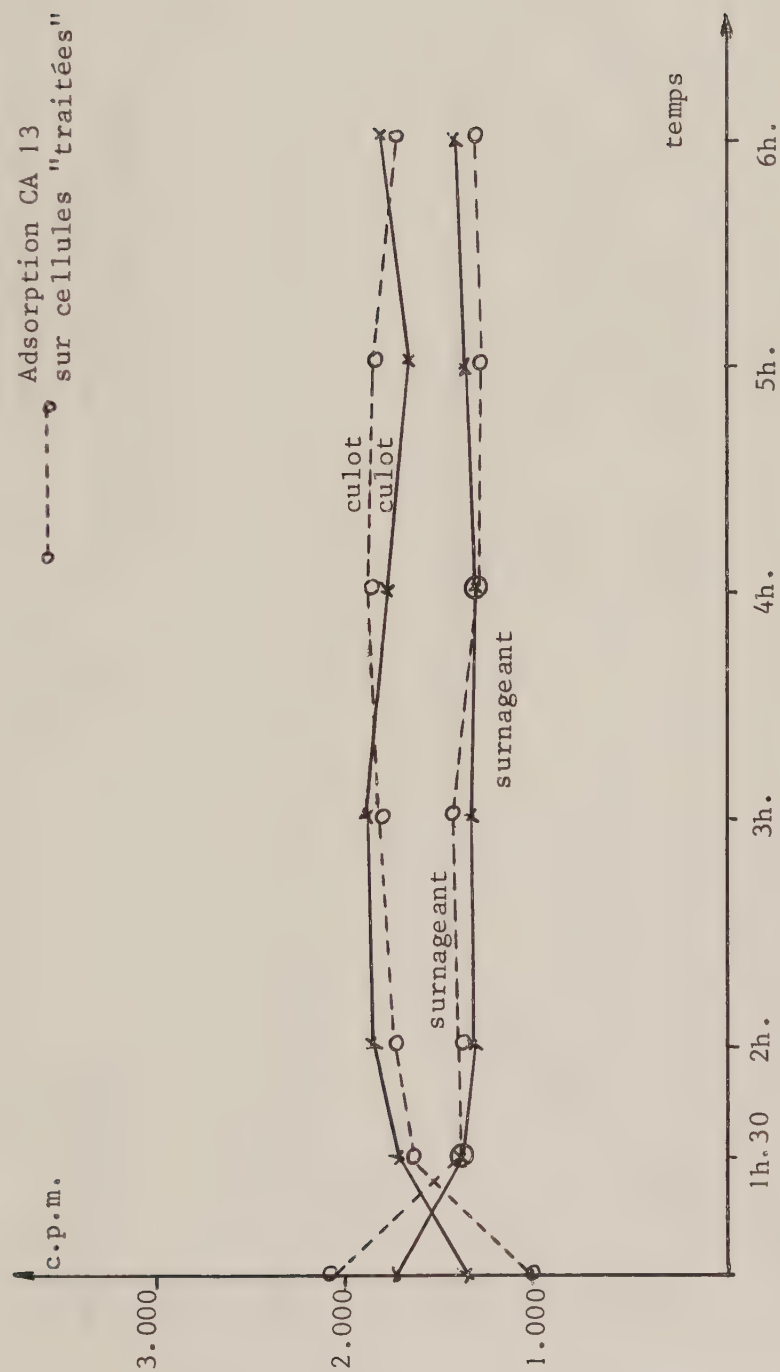


GRAPHE n° II :
ETUDE DU POURCENTAGE D'ADSORPTION DU CA 13 A 37°
SUR CELLULES NORMALES ET CELLULES "TRAITEES"



GRAPHE n° III : ETUDE DE L'ADSORPTION A + 4° DU VIRUS CA 13 MARQUE A L'URIDINE TRITIEE

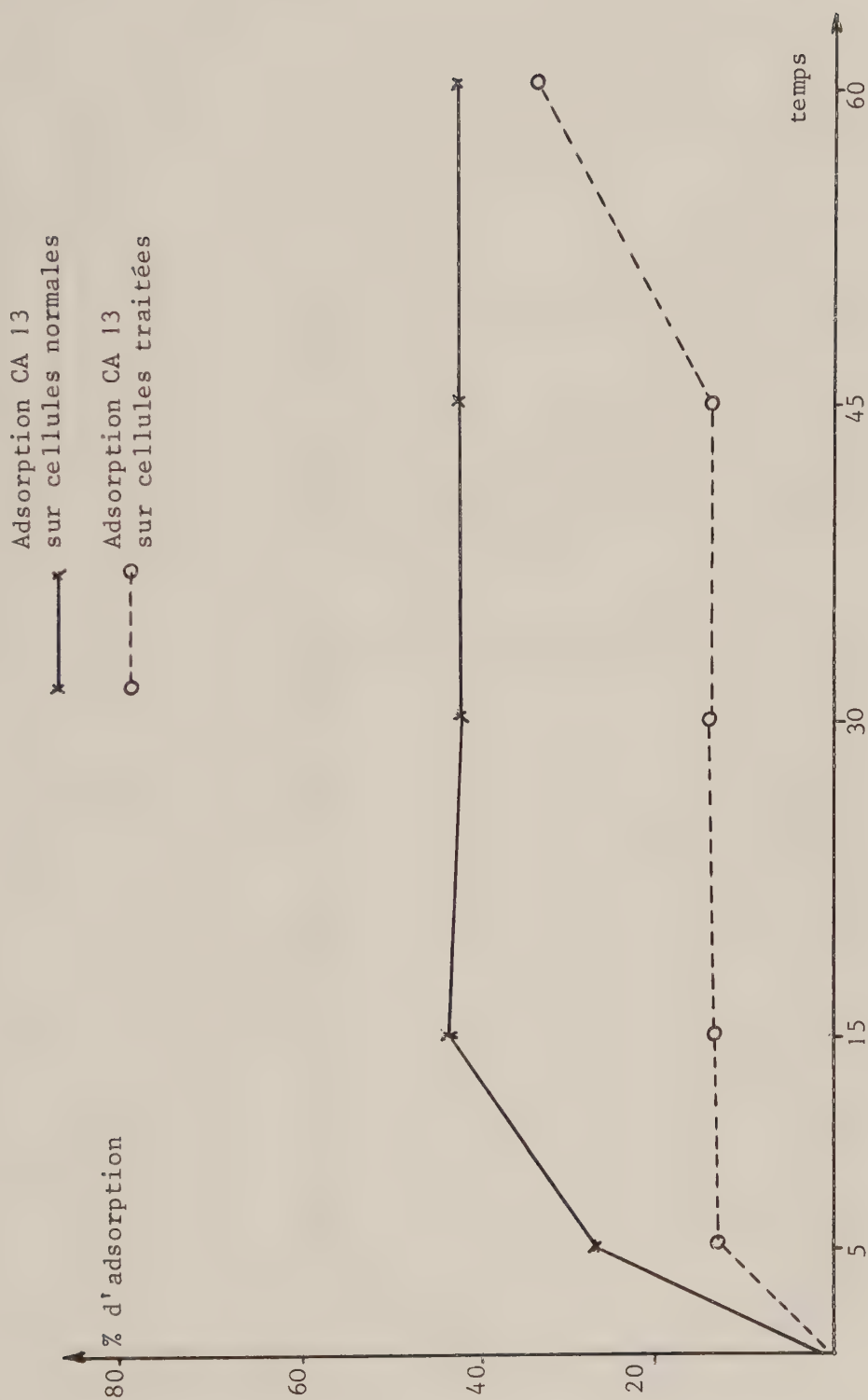
- sur cellules normales,
 - sur cellules traitées.



GRAPHE n° III' :
(Suite du Graphe n° III)

ETUDE DE L'ADSORPTION A + 37° DU VIRUS CA 13
MARQUE A L'URIDINE TRITIEE

- sur cellules WI 38 normales,
- sur cellules WI 38 traitées.



GRAPHE n° IV : ETUDE DU POURCENTAGE D'ADSORPTION DU CA 13 A 4° SUR CELLULES NORMALES
ET CELLULES TRAITEES

Adsorption CA 13
 x — sur cellules normales.
 o - - - - sur cellules "traitées"



GRAPHE n° IV' : ETUDE DU POURCENTAGE D'ADSORPTION DU CA 13 A + 37°
 SUR CELLULES NORMALES ET CELLULES TRAITEES
 (Suite du Graphe n° IV)

BIBLIOGRAPHIE

- ALLISON (A.C.) et VALENTINE (R.C.) :
 Adsorption of Vaccinia and fowl plaque viruses to cells in suspension.
 Biochem. Biophys. Acta, 1960, 40, 393-399.
- BANGHAM (A.D.), DINGLE (J.T.), LUCY (J.A.) :
 Studies on the mode of action of excess of Vitamine A.
 Penetration of lipid monolayers by compounds in the Vitamine A serie.
 Biochem. J., 1964, 90, 133-140.
- BEHBEHANI (A.M.), SULKIN (S.E.) et WALLIS (C.) :
 Factors determining susceptibility of mice to Cocksackievirus infection.
 J. Inf. Dis., 1962, 110, 147-154.
- BEHBEHANI (A.M.), LEE (L.H.) et MELNICK (J.L.) :
 Growth and cationic stabilization of group A Cocksackievirus.
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 125, 983-988.
- BUDHAL (A.D.)
 Effect of carbon dioxide concentration on ability of Cox A 21 to form plaques.
 J. of Bact., 1963, 86, 1356.
- CAME (P.E.) et CROWELL (R.L.) :
 Studies of resistance of foetal mouse tissues in culture to Cocksackie group A viruses.
 Virology, 1964, 23, 542-552.
- DALLDORF (G.) et SICKLES (G.M.) :
 An unidentified filtrable agent isolated from the fécès of children with paralysis.
 Science, 1948, 108, 61.
- DALLDORF (G.), SICKLES (G.M.), PLAGER (H.) et GIFFORD (R.) :
 A virus recovered from the feces of "poliomyelitis" patients, pathogenic for suckling mice.
 J. Exp. Med., 1949, 89, 567.

DALLDORF (G.) et GIFFORD (R.)

Susceptibility of gravide mice to Cocksackievirus infection.
J. Exp. Med., 1954, 99, 21-27.

FELICI (A.), GIANNINI (V.) et FARINA (R.J.) :

Propagation of Cocksackie viruses group A in secondary human
amnion cells.

Estratto dalla Rivista dell'Instituto sieroterapico italiano,
1965, 40, n° 4, Juillet-Aout, 179-182.

GAUDIN (O.G.) et SOHIER (R.)

Les infections à Entérovirus dans "Diagnostic des maladies à
virus".

FLAMMARION Edit., PARIS, 1964.

GEME (J.W. ST.), TOYAMA (P.S.), BRUMBAUGH (J.L.), DIETZ (M.E.) :

Incompetent relationship between Cocksackievirus A 6 ribonucleic
acid and mouse cells.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1967, 125, 58-62.

GENCE (J.W.)

Behaviour of Cocksackievirus 6 in murine cells.

Failure of newer techniques to detect multiplication in vitro.

J. of Bact., 1964, 87, 969

GODENNE (M.O.) et CURNEN (E.C.) :

Propagation of Cocksackievirus on the chorioallantoic membrane
of embryonated eggs.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1952, 81, 81.

GOLDBERG (R.J.), GRAVEN (M.) et CROWELL (R.L.) :

Evidence for the susceptibility of primary fetal mouse cells in
culture to Cocksackievirus A 13.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1969, 132, 743-48.

HEINEBERG (H.), GOLD (E.) et ROBBINS (F.C.)

Différence dans le contenu en interféron des tissus de souris
d'âges variés infectés par un Cocksackievirus B.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 116, 947-953.

JEDDI (M.M.)

Intérêt de la chromatographie sur phosphate de calcium pour la
détermination des caractères phénotypiques de certains Entéro-
virus.

Thèse LYON, 1971, n° 63.

KANTOCH (M.) et KUCZKOWSKA (B.) :

Cultivation of mouse muscle cells on reconstituted collagen.
Archivum Immunologiae et Therapiae experimentalis, 1964, 12, 345.

KANTOCH (M.) et SIEMINSKA (A.) : a

Studies on factors stimulating growth of mouse muscle cultures in vitro.

Archivum Immunologiae et Therapiae experimentalis, 1965, 13, 407.

KANTOCH (M.) et SIEMINSKA (A.) : b

Studies on the susceptibility of mouse muscle cultures to Cocksackie A 4 viruses "in vitro".

Archivum Immunologiae et Therapiae experimentalis, 1965, 13, 413.

KAPLAN (M.M.), WIKTA (J.J.), MAES (R.F.), CAMPBELL (J.B.) et KOPRAWSKI (H.) :

Effect of polyons on the infectivity of rabies virus in tissue culture : construction of a single cycle growth curves.

J. Virol., 1967, 1, 145-151.

KUSANO (T.), WANG (R.), POLLACK (R.) et GREEN (H.) :

Human mouse hybrid cell lines and susceptibility to Polio virus.
II - Polio sensitivity and the chromosome constitution of the hybrids.

J. Virol., 1970, 5, 682-685.

LENAHAN (M.F.) et WENNER (H.A.) :

Propagation of Group A Cocksackie viruses in primary human amnion cells.

I - Cytopathic changes produced by 5 more serotypes.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1961, 107, 544.

LEPINE (P.), VIRAT (J.) et CHAUMONT (L.) :

Le diagnostic sérologique des Cocksackievirus du groupe A.

Ann. Inst. Pasteur, 1962, 103, 475-483.

LIEBERHABER (H.) et TAKEMOTO (K.K.) :

Alteration of plaque morphology of M C virus with polycations.

Virology, 1961, 14, 502-504.

MAC LAREN (L.C.), HOLLAND (J.J.) et SYVERTON (J.J.) :

The mammalian cell virus relationship

II - Adsorption, reception and eclipse of Poliovirus by Hela cells.

J. Exp. Med., 1959, 109, 475.

MANN (J.J.), ROSSEN (R.D.), LEHRIGH (J.R.) et KASEL (J.A.) :

The effect of kaolin on immunoglobulins : an improved technique to remove the non specific serum inhibitor of Reovirus hemagglutination.

J. Immunol., 1967, 98, n° 6, 1136-1142.

- MELNICK (J.L.) et GODMAN (G.C.) :
Pathogenesis of Coxsackievirus infection.
Multiplication and evolution of muscle lesions in mice.
J. Exp. Biol. Med., 1951, 93, 247-266.
- MUFSON (M.A.), JOHNSON (K.M.), BLUM (H.H.), CHANOCK (R.M.) :
Multiplication and cytopathology of Coxsackie A 21 virus in
rotated and stationary tissue culture.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1962, 110, 198-203.
- NEFF (J.M.) et ENDERS (J.F.) :
Poliovirus replication and cytopathogenicity in monolayer hamster
cell cultures fused with Beta propiolactone inactivated Sendai virus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1968, 127, 260-267.
- OKER-BLOM (N.) et NIKKILA (E.) :
Purification of Coxsackievirus by Montmorillonite.
Acta Path. Microbiol. Scand. Suppl., 1952, 93, 340.
- SCHMIDT (N.J.) et LENNETTE (E.H.) : a
Gel double diffusion studies with group B and group A type 9
Coxsackie viruses.
I - The technique and reactions obtained with hyperimmune animal
sera and human sera.
J. Immunol. 1962, 89, 85.
- SCHMIDT (N.J.) et LENNETTE (E.H.) : b
Gel double diffusion studies with group B and group A Coxsackie
viruses.
II - Serologic diagnosis of Coxsackie virus infections by the
gel double diffusion technique.
J. Immunol., 1962, 89, 96.
- SLATER (E.A.) et SYVERTON (J.T.) :
The cultivation of Coxsackievirus.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1950, 74, 509-510.
- SMULL (C.E.) et LUDWIG (E.H.) :
Enhancement of the plaque forming capacity of Poliovirus ribo-
nucleic acid with basic proteins.
J. of Bact., 1962, 84, 1035-1040.
- TYRELL (D.A.J.) et CHANOCK (R.M.) :
Rhinoviruses : a description.
Science, 1963, 141, 152-153.

VOICULESCO (C.) :

Installation différenciée de la résistance chez les souris à l'infection avec des souches de virus Cocksackie A 6 de provenances diverses. Rôle de l'élaboration de l'interféron et des récepteurs cellulaires.

Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., sep. 1966, 25, n° 3, 711-724.

VOICULESCO (C.), DINCULESCU (M.) et EPURAN (E.) :

Cocksackie A 10 virus strains grown in monkey kidney cell culture. Estimate of their immunogenical and pathogenical abilities in new born and aged mice.

European Symposium of poliomyelitis and allied diseases.

BUCAREST, 4-7 Mai 1969.

WALLIS (C.) et MELNICK (J.L.) :

Cationic stabilization.

A new property of Enterovirus.

Virology, 1962, 16, 504-506

WANG (R.), POLLACK (R.), KUSANO (T.) et GREEN (H.) :

Human mouse hybrid cell lines and susceptibility to Poliovirus.

I - Conversion from Polio sensitivity to Polio resistance accompanying loss of human dependant Polio receptors.

J. Virol. 1970, 5, 677-681.

WENNER (A.A.) et LENAHAH (M.F.) :

Propagation of group A Cocksackievirus in tissue cultures.

II - Some interactions between virus and mammalian cells.

The Yale J. Biol. Med., 1961, 34, 421-428.

WILLMER (E.N.) :

Steroids and cell surfaces.

Biol. Rev. Cambridge Phil. Soc., 1961, 36, 368-398

ZAJAC (I.) et CROWELL (R.L.) :

Location and regeneration of Enterovirus receptors of Hela cells.

J. of Bact., 1965, 89, 1097.

TABLES DES MATIERES

- Introduction	1
- CHAPITRE PREMIER - MATERIEL ET METHODES	5
* - Cultures de tissu	5
* - Préparation des suspensions virales	6
* - Technique de chromatographie	8
* - Titration des suspensions virales	10
* - Technique de neutralisation sur cellules	11
* - Technique de marquage radio-actif à l'aide d'uridine tritiée d'une suspension de Cocksackie A 13	12
- CHAPITRE DEUXIEME - ETUDE DE LA SENSIBILITE DE DIFFERENTS SYSTEMES CELLULAIRES AUX COXSACKIEVIRUS A	16
* - Matériel viral et cellulaire utilisés	16
* - Résultats	17
* - Identification des souches adaptées à la cellule WI 38	19
- CHAPITRE TROISIEME - ETUDE DU COMPORTEMENT EN CHROMATOGRAPHIE DE DEUX TYPES DE COXSACKIEVIRUS A : TYPES A1 ET A 13	20
* - Suspensions virales utilisées	20
* - Diagrammes d'élution des différentes suspensions virales	21
* - Résultats	21
- CHAPITRE QUATRIEME - ETUDE DE L'ADSORPTION DES VIRUS COXSACKIE A SUR CELLULES Am 57	24
* - Essais de modification des récepteurs de la membrane cellu- laire	24
* - Recherche d'inhibiteurs éventuels empêchant l'adsorption des Cocksackievirus A sur cellules.....	28
* - Recherche d'une éventuelle interférence entre deux Coxsa- ckievirus A	30
* - Etude de l'adsorption sur cellules WI 38 normales et traitées du Cocksackievirus A 13 marqué à l'uridine tritiée	31
- CHAPITRE CINQUIEME - DISCUSSION	35
* - Problèmes posés par l'isolement des Cocksackievirus A sur cultures de tissu	35
* - Quels sont les moyens dont on dispose pour favoriser l'atta- chement des virions sur cellules in vitro ?	37
* - Problème fondamental posé par les Cocksackievirus A	39
* - Etude des caractères des virions constituant les suspensions de Cocksackievirus A 1 et de Cocksackievirus A 13	42
* - Hypothèses pour une expérimentation future	43
- RESUME	44
- CONCLUSIONS	46
- TABLEAUX - FIGURES - SCHEMAS	48
- BIBLIOGRAPHIE	73
- TABLE DES MATIERES	78

